F 1330

KAT

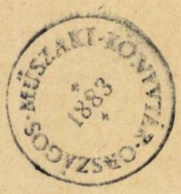
ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

1
ANUL V
1962

studii şi cercetări de biochimie

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE



STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

1

ANUL V

1962

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

COMITETUL DE REDACȚIE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI, *redactor responsabil*; ACADEMICIAN R. VLĂDESCU; D. ISĂCESCU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; S. OERIU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; E. SORU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; M. MEZINCESCU; H. SLUȘANSCHI, *redactor adjunct*; I. VASILESCU; V. ALEXANDRESCU, *secretar tehnic de redacție*.

REVISTA STUDII ȘI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

APARE DE 4 ORI PE AN

Redacția: BUCUREȘTI, str. Popovici nr. 20.
Telefon 18.43.55—17.79.63

MŰSZAKI EGYETEM 1983

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul V, nr. 1 1962

SUMAR

Pag.

VICTORIA ALEXANDRESCU, Localizarea activităţii amilazei şi invertazei pe fracţiunile proteice solubile din seminţele de porumb 7

LIA ARNET, Inhibarea prin uree a peroxidazei din frunzele de porumb şi efectul protector al ionilor de cupru 17

I. CATRINA, H. D. SCHELL, CORINA IORDACHE şi CORNELIA NIŢU, Cercetări fiziologice şi biochimice în legătură cu fenomenul de uscare a stejarului 25

MIOARA CÂRSTEANU, Influenţa coacervatului ser-gumă arabică asupra activităţii catalazei hepatice de cal şi a catalazei extrase din grîu . . . 39

GEORGETA ENĂCHESCU, I. ŞOLDEA şi RODICA MARINESCU, Modificările biochimice ale bulbilor de ceapă în timpul iernii 47

VICTOR GHEŢIE şi LUCIA BUZILĂ, Crioproteinele vegetale. Notă preliminară 65

G. HARALAMBIE, Reacţia urorozeinei în efortul fizic 77

FLORICA MOŢOC şi SMARANDA CONSTANTINESCU, Capacitatea de transaminare a ficatului în cursul procesului neoplazic 91

C. ŞELARIU şi S. MIHĂESCU, Repartiţia transaminazelor pe fracţiunile electroforetice ale proteinelor solubile din mitocondriile de creier şi ficat de şobolan 97

ODETTE ZAHARIA, Oxidarea unor aminoacizi în prezenţa sistemului polifenoloxidazic din plante 103

NOTE DE LABORATOR

E. MACOVSCHI, A. MIHĂESCU şi A. POPESCU, Procedeu pentru măsurarea endosmozei iodului în colul uterin 113

S. ANTOHI şi MARIA ANTOHI, Dispozitiv de electroforeză microscopică pentru particule biologice în suspensie 117

AL V-LEA CONGRES INTERNAŢIONAL DE BIOCHIMIE 121

RECENZII 131

CRONICA BIOCHIMIEI DIN R.P.R. 161

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOCHIMIE

ÉTUDES ET RECHERCHES DE BIOCHIMIE

Tome V, nº 1 1962

SOMMAIRE

Page

VICTORIA ALEXANDRESCU, Localisation de l'activité de l'amylase et de l'invertase dans les fractions protéiques solubles des semences de maïs 7

LIA ARNET, L'action inhibitrice de l'urée sur la peroxydase des feuilles de maïs et l'effet protecteur des ions de cuivre 17

I. CATRINA, H. D. SCHELL, CORINA IORDACHE et CORNELIA NIŢU, Recherches physiologiques et biochimiques en rapport avec le phénomène de mort du chêne 25

MIOARA CÂRSTEANU, L'influence du coacervat sérum-gomme arabique sur l'activité de la catalase hépatique du cheval et sur l'activité de la catalase du blé 39

GEORGETA ENĂCHESCU, I. ŞOLDEA et RODICA MARINESCU, Les modifications biochimiques des bulbes d'oignon pendant l'hiver 47

VICTOR GHEŢIE et LUCIA BUZILĂ, Les cryoprotéines végétales. Note préliminaire 65

G. HARALAMBIE, La réaction de l'urororoséine au cours de l'effort physique 77

FLORICA MOŢOC et SMARANDA CONSTANTINESCU, La capacité de transamination du foie au cours du processus néoplasique 91

C. ŞELARIU et S. MIHĂESCU, La répartition des transaminases suivant les fractions électrophorétiques des protéines solubles contenues par les mitochondries du cerveau et du foie de rat 97

ODETTE ZAHARIA, L'oxydation de certains acides aminés en présence du système polyphénoloxydasique des plantes 103

NOTES DE LABORATOIRE

E. MACOVSCHI, A. MIHĂESCU et A. POPESCU, Procédé pour la mesure de l'endosmose de l'iode dans le col utérin 113

S. ANTOHI et MARIA ANTOHI, Dispositif pour l'électrophorèse microscopique des particules biologiques en suspension 117

LE Vème CONGRÈS INTERNATIONAL DE BIOCHIMIE 121

COMPTES RENDUS 131

CHRONIQUE DE LA BIOCHIMIE DANS LA R. P. ROUMAINE . 161

ÉDITIONS DE L'ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE

АКАДЕМИЯ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

ТРУДЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ ПО БИОХИМИИ

Том V, № 1 1962

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

ВИКТОРИЯ АЛЕКСАНДРЕСКУ, Локализация активности амилазы и инвертазы по белковым фракциям семян кукурузы 7

ЛИЯ АРНЕТ, Торможение мочевиной пероксидазы из листьев кукурузы и предохраняющий эффект ионов меди 17

И. КАТРИНА, Х. Д. ШЕЛЛ, КОРИНА ИОРДАКЕ и КОРНЕЛИЯ НИЦУ, Физиологические и биохимические исследования, связанные с явлением высыхания дуба 25

МИОАРА КЫРСТЯНУ, Влияние коацервата сыворотки с гуммиарабиком на активность каталазы печени лошади и каталазы, экстрагированной из пшеницы 39

ДЖЕОРДЖЕТА ЕНЭКЕСКУ, И. ШОЛДЯ и РОДИКА МАРИНЕСКУ, Биохимические изменения луковиц лука в зимнее время . . . 47

ВИКТОР ГЕЦИЕ и ЛУЧИЯ БУЗИЛЭ, Растительные криопротеины. Предварительное сообщение 65

Г. ХАРАЛАМБИЕ, Реакция уророзеина при физической нагрузке . . 77

ФЛОРИКА МОЦОК и СМАРАНДА КОНСТАНТИНЕСКУ, Способность трансаминирования печени во время неоплазматического процесса 91

К. ШЕЛАРИУ и С. МИХЭЕСКУ, Распределение трансаминаз по электрофоретическим фракциям растворимых белков митохондрий мозга и печени крысы 97

ОДЕТТ ЗАХАРИЯ, Окисление некоторых аминокислот в присутствии полифенолоксидазной системы растений 103

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Е. МАКОВСКИ, А. МИХЭЕСКУ и А. ПОПЕСКУ, Процесс измерения эндосмоса йода в шейке матки 113

С. АНТОХИ и МАРИЯ АНТОХИ, Прибор микроскопического электрофореза для биологических частиц суспензии 117

ПЯТЫЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС 121

РЕЦЕНЗИИ 131

ХРОНИКА БИОХИМИИ В РНР 161

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ

LOCALIZAREA ACTIVITĂȚII AMILAZEI ȘI INVERTAZEI PE FRACȚIUNILE PROTEICE SOLUBILE DIN SEMINȚELE DE PORUMB

DE

VICTORIA ALEXANDRESCU

Cercetarea localizării activității enzimelor pe fracțiunile proteice de proveniențe diferite și obținute prin diverse metode (precipitări sau dizolvări selective, electroforeză etc.) se află în atenția biochimiștilor. S-a lucrat mai mult pe proteine de proveniență animală, ca de exemplu proteinele serice [1], [2], [3], hepatice [4], [5] și cele din mitocondriile de ficat și creier [6]. În ceea ce privește localizarea activității enzimelor pe fracțiunile proteinelor de proveniență vegetală, cercetările sînt de abia la început. Așa de exemplu, V. L. Kretovici și colaboratori [7] au cercetat activitatea enzimatică a proteinelor din semințele de mazăre : legumelina (albumină), vicilina și legumina (globuline), obținute prin extracție și precipitări selective care nu duc la denaturarea proteinelor, și au dovedit că proteinele de rezervă ale plantelor posedă funcțiuni enzimatice și nu reprezintă un material inert.

Proteinele solubile din semințele de porumb au fost cercetate folosindu-se diverse soluții extractante, precipitări selective și analiza electroforetică în mediu lichid. Astfel, J. F. Foster și colaboratori [8] au folosit ca extractant apa, soluții saline, soluție tampon carbonat de sodiu-bicarbonat de sodiu și soluții cu detergent. Analiza electroforetică a extractului cu detergent din făina totală de porumb indică prezența a 8 componente, din care 3 au fost identificate ca zeină. E. T. Mertz și colaboratori [9] au studiat proteinele din porumbul U.S., separat pe extracte din germeni și endospermi. Ca extractant au folosit pentru endospermi o soluție alcalină de cupru, iar pentru germeni o soluție de clorură de sodiu în tampon acid boric-borax. În aceste condiții, electroforegramele proteinelor totale extrase din endospermii porumbului arată prezența a 6 componente, din care 5 ar fi proteice și una un polizaharid, iar electroforegra-

mele proteinelor extrase din germeni indică prezența a cel puțin 6 componente.

Lucrarea de față se ocupă de localizarea activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice solubile din endospermii și germenii de porumb, separate prin electroforeza pe hîrtie. S-a folosit ca metodă de fracționare a proteinelor electroforeza pe hîrtie, deoarece prin eluarea fracțiunilor de pe electroforegrame s-a putut determina localizarea activității enzimelor respective.

În literatura consultată nu s-a găsit indicată fracționarea proteinelor din semințele de porumb prin electroforeza pe hîrtie. De aceea, întîi s-au cercetat condițiile optime pentru separarea pe această cale a proteinelor solubile din endospermii și germenii semințelor de porumb și apoi s-a determinat localizarea activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice obținute. Cercetările s-au efectuat pe semințe de porumb ICAR 54.

MODUL DE LUCRU

Pentru separarea endospermilor de germeni, semințele de porumb s-au ținut în apă timp de 3—4 ore la temperatura camerei, apoi cu ajutorul unui bisturiu s-a îndepărtat învelișul bobului și s-a separat manual germenele de endosperm. După uscare la temperatura camerei, endospermii s-au măcinat în cantități mici, pentru ca moara de laborator să nu se încălzească, iar făina s-a trecut printr-o sită cu ochiuri de 0,5 mm. Embrionii s-au mojarat.

Ca extractant al proteinelor din endospermii de porumb s-a încercat la început soluția alcalină de cupru [9], dar proteinele extrase pe această cale posedă o slabă activitate invertazică și nici o activitate amilazică, ceea ce arată că în timpul extracției proteinele suferă modificări care afectează proprietățile lor enzimatice. S-au folosit apoi ca extractanți soluțiile tampon medinal-acetat de sodiu-acid clorhidric, medinal-veronal, acid boric-borax și acid succinic-hidroxid de sodiu, pH 8,2, precum și soluția de clorură de sodiu sau apa distilată. În aceste cazuri s-a constatat că activitatea celor două enzime se păstrează.

Pentru extracția substanțelor proteice din *endospermi* s-au luat probe de cîte 10 g și s-a adăugat 20 ml soluție tampon acid succinic (0,013 M/l) — hidroxid de sodiu (0,0224 M/l), pH 8,2—8,4. Probele s-au agitat timp de o oră la temperatura camerei, la un agitator mecanic. Extracția s-a continuat apoi la frigider, la +6°C, încă 18 ore. La fiecare probă s-a adăugat apoi 20 ml n-butanol, s-a agitat puternic 7—10 min pentru extracția lipidelor [11], după care s-a centrifugat timp de 10 min la 2 000 ture/min. Extracția cu butanol s-a mai repetat o dată, realizîndu-se o concentrație a butanolului de 66%. Extractul astfel obținut s-a supus dializei față de același tampon, timp de 12—16 ore, pentru a se îndepărta urmele de butanol. Concentrarea extractului s-a făcut prin perevaporare cu un curent de aer rece sau prin evaporare în vid, într-un exsicator cu

clorură de calciu anhidră, pînă la o concentraţie de 4—7% substanţă proteică.

Extracţia substanţelor proteice din *embrioni* s-a efectuat după metoda descrisă de E. T. Mertz şi colaboratori [9], la care însă s-au modificat proporţiile: 2 g embrioni de porumb neîncolţit s-au mojarat în prezenţa a 1 ml soluţie tampon acid boric-borax, pH 8,2. S-au adăugat apoi încă 4 ml soluţie tampon şi 5 ml soluţie de clorură de sodiu 12,5%, după care proba s-a îngheţat şi dezgheţat de trei ori. S-a adăugat încă 5 ml soluţie de clorură de sodiu şi s-a agitat 2 ore la un agitator mecanic. Extracţia s-a repetat cu 15 ml amestec (2 ml soluţie tampon acid boric-borax şi 8 ml soluţie de clorură de sodiu 12,5%) şi s-a agitat timp de o oră şi jumătate. Cele două supernatante s-au unit şi s-au extras cu butanol, apoi s-a dializat şi concentrat ca şi în cazul extracţiei substanţelor proteice din endospermi.

Pentru cercetarea *zeinei* s-a folosit exact metoda descrisă de B. L. Scallet [12]: o parte făină de porumb s-a extras cu 10 părţi alcool etilic 72% la temperatura camerei, mai multe zile, agitîndu-se din cînd în cînd. Extractul s-a filtrat şi s-a amestecat încet cu aproximativ 3 volume de soluţie rece de clorură de potasiu 0,1 M, mişcînd vasul încontinuu. Materialul coagulat s-a filtrat printr-un tifon. Precipitatul s-a redizolvat în alcool etilic 72%, s-a agitat cu un volum egal de eter de petrol, iar amestecul s-a turnat încet în soluţie rece de clorură de potasiu. Eterul de petrol s-a decantat. Precipitatul proteic s-a redizolvat şi tratat din nou cu eter de petrol. Produsul final, de culoare galbenă, s-a uscat într-un exsicator cu clorură de calciu, cu vid.

Pentru a stabili dacă prolamina (zeina) din endospermi este prezentă în cazul extracţiei cu soluţie tampon acid succinic-hidroxid de sodiu, s-a extras zeina după metoda indicată şi s-a lăsat în prezenţa soluţiei tampon acid succinic-hidroxid de sodiu mai întîi timp de 2 ore la temperatura camerei, apoi 48 de ore la frigider, agitînd din cînd în cînd eprubeta respectivă, şi s-a constatat că zeina nu se dizolvă în soluţia tampon.

Electroforeza proteinelor obţinute s-a încercat în soluţiile tampon medinal-acetat de sodiu-acid clorhidric, medinal-veronal, acid boric-borax şi acid succinic-hidroxid de sodiu. S-a constatat că nu se obţine o separare satisfăcătoare a fracţiunilor proteice în nici una din ele. V. Gheţie [10], cercetînd proteinele din seminţele de bob, a arătat că ionul fosfat are proprietatea de a mări puterea de rezoluţie a soluţiei tampon acid boric-borax. Încercînd adaosul de fosfat disodic la fiecare din cele patru soluţii tampon, s-a constatat că în cazul soluţiei tampon acid succinic-hidroxid de sodiu sau medinal-acetat de sodiu-acid clorhidric el determină creşterea puterii de rezoluţie a tamponului respectiv. Pentru cercetările noastre ne-am oprit la soluţia tampon acid succinic-hidroxid de sodiu cu adaos de fosfat disodic, pH final 8,2—8,4 (200 ml soluţie tampon acid succinic 0,026 M/l — hidroxid de sodiu $\approx$ 0,0448 M/l, la care s-au adăugat 200 ml soluţie de fosfat disodic N/30 şi 50 ml apă distilată şi s-a adus cu o soluţie de hidroxid de sodiu normal la pH 8,2—8,4). Determinările s-au făcut pe hîrtie Whatman nr. 1, folosindu-se o cădere de

potențial de 7 V/cm timp de 9 ore, intensitatea curentului fiind de 0,5 mA/cm.

În cazul zeinei s-a folosit pentru electroforeză o soluție alcoolică 50% în acest tampon. În acest caz, intensitatea curentului a fost de 0,1 mA/cm. S-a încercat și electroforeza zeinei în soluție tampon obișnuită, însă zeina precipită pe start și nici o parte din ea nu este antrenată de curentul electric.

Punerea în evidență a fracțiunilor proteice s-a făcut cu o soluție de albastru de bromfenol și evaluare fotometrică directă cu densitometrul MGF după diafanizarea benzii de hîrtie [13]. Determinarea cantitativă a procentului fracțiunilor proteice separate s-a făcut prin metoda eluției, cu citirea extincțiilor la fotocolorimetrul FEK—M 1951 [14].

Pentru urmărirea acțiunii amilazei și a invertazei, la electroforeză s-au folosit benzi late de 4 cm. După electroforeză s-a decupat cîte o porțiune de 1 cm în lungimea acestor benzi, care s-a uscat și colorat. Cu ajutorul ei s-au delimitat fracțiunile proteice de pe restul benzii late de 3 cm. Electroforegramele proteinelor din endospermi și germeni s-au împărțit în fracțiunile respective, porțiunea de la start și partea frontală albă (3 cm) a electroforegramei. Fracțiunile respective s-au decupat. Pentru determinarea activității enzimelor de pe fracțiunile proteice obținute prin electroforeza pe hîrtie a extractului de proteine din endospermi, era necesar să se unească fracțiunile respective de pe două electroforegrame pentru amilază și de pe trei electroforegrame pentru invertază. În cazul proteinelor extrase din embrioni, pentru determinarea activității atît a amilazei cît și a invertazei era necesară unirea fracțiunilor respective de pe patru electroforegrame. Porțiunile decupate s-au tăiat mărunt și s-au lăsat pentru eluție în 3 ml soluție tampon acid acetic-acetat de sodiu, pH 4,8, timp de 16 ore, la frigider. Apoi cîte 2 ml din fiecare probă s-au pus în prezența a 2 ml soluție de substrat. Pentru amilază s-a folosit ca substrat o soluție 1% de amidon în apă distilată, iar pentru invertază o soluție 10% de zaharoză în tampon acetat de sodiu-acid acetic, pH 4,8. Eprubetele s-au închis bine cu dopuri de vată, după ce s-a adăugat puțin toluen și s-au lăsat timp de 16 ore la 37°C. Determinarea conținutului de substanțe reducătoare obținute în urma acțiunii enzimelor s-a făcut după principiul metodei Hagedorn-Jensen, modificată de Ch. S. Hanes [15]. Proba martor cuprindea toți reactivii, cu excepția eluatului cu enzima, care s-a înlocuit cu eluatul hîrtiei Whatman nr. 1. Deoarece există echivalență între cantitatea de substanțe reducătoare formate prin hidroliza amidonului sau a zaharozei de enzimele respective și numărul de ml de tiosulfat de sodiu folosiți, rezultatele sînt date în ml tiosulfat de sodiu N/100.

REZULTATE

Electroforeza pe hîrtie a extractului proteic din endospermii semințelor de porumb arată prezența a 5 fracțiuni. Fracțiunile au fost denumite cu literele mari ale alfabetului, de la *A* la *E*, în ordinea migrării, *A*

fiind fracţiunea cea mai apropiată de start, cu mobilitatea $0{,}63.10^{-5}$ cm²/s/V, iar *E* fracţiunea cea mai îndepărtată, cu mobilitatea $2{,}03.10^{-5}$ cm²/s/V. În tabela 1 sînt redate, pentru orientare, valorile procentuale relative ale fracţiunilor proteice din endospermi, precum şi mobilităţile lor.

Tabela 1

Procentul relativ şi mobilitatea fracţiunilor proteice din endospermul de porumb

Denumirea fracţiunilor	*A*	*B*	*C*	*D*	*E*	Partea frontală
Procentul relativ	19,0	22,0	23,5	18,5	12,0	5,0
Mobilitatea $x.10^{-5}$ cm²/s/V	0,63	0,98	1,33	1,64	2,03	—

Pentru a ne da seama de natura fracţiunilor proteice extrase din endospermi şi puse în evidenţă pe cale electroforetică în cazul nostru, paralel cu extracţia în soluţia tampon amintită am efectuat şi cîte o extracţie în apă distilată, soluţie de clorură de sodiu 10% şi soluţie de hidroxid de sodiu pH 9. După cum s-a arătat şi în alte lucrări [16], [17], nu avem de a face cu o extracţie selectivă în adevăratul înţeles al cuvîntului, căci în toate cazurile avem din punct de vedere calitativ un tablou electroforetic mai mult sau mai puţin asemănător cu extracţia în soluţia tampon folosită, cu deosebirea netă a aspectului cantitativ al fiecărei fracţiuni. Acest fapt este datorit prezenţei în materialul biologic cercetat atît a ionilor liberi, cît şi a sistemelor tampon. Astfel, extractul în apă prezintă toate fracţiunile ca şi extractul în soluţia tampon acid succinic-hidroxid de sodiu. Fracţiunile obţinute însă din extractul în apă sau în soluţie tampon acid succinic-hidroxid de sodiu nu sînt albumine, deoarece, chiar la concentraţie de sulfat de amoniu de 60%, în supernatant rămîn fracţiunile *A* şi *B* cu mobilitatea cea mai mică, iar pe electroforegramă nu se găseşte nici o altă fracţiune cu mobilitate mare, care ar putea fi albumină. Extracţia cu soluţie de clorură de sodiu, indicată pentru globuline, prezintă 3 fracţiuni puternice în regiunea fracţiunilor *A*, *B*, *C*, celelalte fiind slab reprezentate, iar extracţia în soluţie de hidroxid de sodiu pH 9, indicată pentru gluteline, prezintă 3 fracţiuni puternice în regiunea fracţiunilor *C*, *D*, *E*.

Zeina nu se extrage în soluţia tampon folosită. Electroforeza zeinei în soluţie alcoolică în tampon arată prezenţa a 2 fracţiuni. B. L. S c a l l e t [12] a arătat că la zeină, datorită proprietăţii sale de disociere şi asociere a particulelor constituente, se pot obţine prin electroforeză în mediu lichid de la 1—6 fracţiuni.

Din cele arătate reiese că endospermii seminţelor de porumb conţin 3 componente principale : prolamina, glutelina şi globulina, însă în cazul nostru extractul obţinut cu ajutorul soluţiei tampon acid succinic-hidroxid de sodiu conţine globuline şi gluteline. Prolaminele nu se extrag, iar albumina nu poate fi pusă în evidenţă.

Cercetîndu-se localizarea activităţii amilazei şi invertazei din endospermi pe fracţiunile proteice obţinute prin electroforeză pe hîrtie, s-a

constatat, după cum reiese din tabela 2, că activitatea maximă a amilazei, cît şi a invertazei, se află pe fracţiunile *A* şi în special *B*, unde cantitatea de substanţe reducătoare care s-a format reduce toată cantitatea de fericianură de potasiu adăugată în reacţie. O activitate mai slabă se observă şi pe fracţiunile învecinate. E de remarcat că în fracţiunea *E* atît activitatea

Tabela 2

Repartiţia activităţii amilazei şi invertazei pe fracţiunile proteice solubile din endospermul de porumb

(Rezultatele sînt date în ml tiosulfat de sodiu N/100)

Enzima	Start	*A*	*B*	*C*	*D*	*E*	Partea frontală
Amilază	0	0,60	<3,40	0,20	0,20	0,45	0,20
Invertază	0,05	0,70	<3,05	0,30	0,05	0,20	0,05

amilazică cît şi cea invertazică sînt mai mari decît în fracţiunea *D*, ceea ce ar pleda pentru existenţa în condiţiile noastre a 2 amilaze şi 2 invertaze în endospermi: una foarte activă, asociată în cea mai mare parte cu fracţiunea proteică *B*, iar a doua asociată cu fracţiunea proteică *E*. R. L. Mc Geachin şi J. P. Lewis [1] au constatat că amilaza din serul de şoarece şi şobolan, după electroforeză, se găseşte asociată cu fracţiunile proteice albumină şi γ-globulină, amilaza serului uman normal este asociată numai cu fracţiunea albumină, pe cînd amilazele salivară şi pancreatică sînt asociate cu γ-globulinele. De asemenea, A. I. Oparin şi M. S. Bardinskaia [18] au arătat că invertaza din drojdie prezintă din punct de vedere electroforetic 2 fracţiuni, una de bază, foarte activă, şi o a doua mai puţin activă.

Electroforeza pe hîrtie a extractului proteic din germenii semînţelor de porumb ICAR 54 arată, în condiţiile noastre de lucru, prezenţa a 4 racţiuni, pe care le-am denumit cu literele mici ale alfabetului, de la *a* a *d*, în ordinea migrării, *a* fiind fracţiunea cea mai apropiată de start, iar *d* fracţiunea cea mai depărtată. Valorile procentuale relative şi mobilităţile acestor fracţiuni sînt redate în tabela 3.

Tabela 3

Procentul relativ şi mobilitatea fracţiunilor proteice din germenul de porumb

Denumirea fracţiunilor	*a*	*b*	*c*	*d*	Partea frontală
Procentul relativ	20	32	28	12	8
Mobilitatea $x.10^{-5}$ $cm^2/s/V$	1,08	1,54	1,82	2,20	—

E. T. Mertz şi colaboratori [9] au arătat că există asemănare între electroforegramele proteinelor din germenii semînţelor de porumb

extrase cu reactiv cupric alcalin şi ale celor extrase în soluţie de clorură de sodiu 10% (precizăm că în cazul endospermilor autorii extrag cu ajutorul reactivului cupric alcalin proteine din toate categoriile). Aceasta arată că proteinele extrase din germenii seminţelor de porumb ar fi în special globuline. În condiţiile noastre se separă net numai 4 fracţiuni. Se pare că fracţiunea *a* ar fi formată din 2 fracţiuni foarte apropiate, iar în partea frontală a benzii se găsesc încă proteine în cantitate mică (8%).

În ceea ce priveşte fracţiunile proteice pe care sînt localizate amilaza şi invertaza din germeni, rezultatele sînt date în tabela 4.

Tabela 4

Repartiţia activităţii amilazei şi invertazei pe fracţiunile proteice solubile din germenul de porumb

(Rezultatele sînt date în ml tiosulfat de sodiu N/100)

Enzima	Start	*a*	*b*	*c*	*d*	Partea frontală
Amilază	0	0,80	0,40	0,70	0,30	0
Invertază	0	0,25	0,05	0,05	0,05	0,20

Se constată că activitatea amilazei este localizată în special pe fracţiunile *a* şi *c*, iar activitatea invertazei pe fracţiunea *a* şi pe partea frontală a electroforegramei. Ca şi în cazul endospermului, localizarea activităţii enzimatice nu este absolut strictă pe aceste fracţiuni, ci se găseşte ca urme şi pe fracţiunile învecinate. S-ar părea deci că endospermul şi germenul seminţelor de porumb ar conţine 2 amilaze şi 2 invertaze cu locuri de formare diferite, deci cu structuri diferite, ceea ce ar determina şi o mobilitate diferită.

Făcînd o comparaţie între cantitatea de proteine solubile din extractele de germeni şi endospermi şi activitatea enzimatică, se constată că pentru germeni concentraţia proteică din extractele folosite a fost de obicei aproximativ de 4%, iar pentru endospermi de 7%. Cu toate acestea, activitatea enzimatică a endospermilor este mai mare decît dublu. Reiese că pentru concentraţii proteice egale în extract, activitatea amilazei şi a invertazei este mai mare în endospermi.

În ceea ce priveşte cantitatea de proteine solubile, se constată însă că ea este mai mare în germeni, unde avem o extracţie din 2 g material, decît în endospermi, unde avem extracţia din 10 g făină.

Comparînd calitativ fracţiunile proteinelor cu ajutorul mobilităţilor electroforetice ale fracţiunilor separate, redate în tabelele 1 şi 3, se constată că aceste mobilităţi sînt caracteristice pentru fiecare fracţiune. Totuşi, valoarea mobilităţii electroforetice a fracţiunii *B* din endosperm este foarte apropiată de aceea a fracţiunii *a* din germen. Această asemănare este bazată desigur pe sarcina electrică a moleculelor respective, dar probabil, după cum reiese din tabelele 2 şi 4, unde sînt redate activitatea amilazei şi invertazei, ea este bazată şi pe existenţa unui fond proteic comun, format în cazul nostru de cele două enzime studiate.

Stabilirea localizării activității enzimelor pe fracțiunile proteice solubile din endospermi și germeni reprezintă una din căile de cercetare ale transformărilor pe care le suferă proteinele în procesul de încolțire a semințelor respective, problemă asupra căreia vom reveni într-o lucrare viitoare.

CONCLUZII

Prin datele obținute în această lucrare s-au adus unele contribuții la cunoașterea proteinelor și a localizării amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice din endospermul și germenul seminței de porumb.

Electroforeza pe hîrtie a proteinelor solubile din endospermi arată prezența a 5 fracțiuni, formate în special din gluteline și globuline, care s-au notat cu literele de la *A* la *E*. Zeina supusă electroforezei în soluție alcoolică prezintă două fracțiuni. Electroforegramele extractului proteic din germeni arată prezența a 4 fracțiuni, formate în special din globuline, care s-au notat cu literele de la *a* la *d*.

Activitatea amilazei și invertazei se repartizează la endospermi pe trei fracțiuni, iar la germeni pe două fracțiuni. În cazul endospermilor, ambele enzime se localizează pe fracțiunile *A*, *B* și *E*, iar în cazul germenilor ele se repartizează diferit: amilaza pe fracțiunile *a* și *c*, iar invertaza pe fracțiunea *a* și pe partea frontală a electroforegramei respective.

Comparînd fracțiunile proteice din punct de vedere calitativ, pe baza valorii mobilității, se constată că fracțiunea *B* a endospermilor este asemănătoare cu fracțiunea *a* a germenilor. Această asemănare este bazată desigur pe sarcina electrică a moleculelor, dar probabil și pe existența unui fond proteic comun, cum a reieșit din stabilirea localizării activității celor două enzime.

Procentual, germenii conțin mai multe substanțe proteice decît endospermii. Activitatea amilazei și a invertazei este însă mult mai mare în endosperm decît în germen.

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
București

Prezentată la redacție la 25 octombrie 1961

ЛОКАЛИЗАЦИЯ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ И ИНВЕРТАЗЫ ПО БЕЛКОВЫМ РАСТВОРИМЫМ ФРАКЦИЯМ СЕМЯН КУКУРУЗЫ

РЕЗЮМЕ

Исследования проводились на кукурузе сорта ИКАР 54, отделенной от эндоспермов и ростков. В результате электрофореза на бумаге растворимых белков эндоспермов выявляется наличие пяти

фракций, состоящих, главным образом, из глутеллинов и глобулинов, отмеченных от *A* до *E*. Подвергнутый электрофорезу зеин в спиртовом растворе представляет две фракции. Электрофореграммы белкового экстракта ростков выявляют наличие четырех фракций, состоящих, главным образом, из глобулинов, отмеченных от *a* до *d*.

Активность амилазы и инвертазы распределяется у эндоспермов на три фракции, а у ростков на две фракции. *B* случае эндоспермов, оба энзима локализуются во фракциях *A*, *B* и *E*, а в случае ростков — распределяются различным образом: амилаза во фракциях *a* и *c*, а инвертаза — в фракции *a* и во фронтальной части соответствующей электрофореграммы.

Сравнивая белковые фракции с качественной точки зрения, на основании значения подвижности, можно констатировать, что фракция *B* эндоспермов похожа на фракцию *a* ростков. Это сходство основано, без сомнения, на электрозаряде молекул, а также на наличии общего белкового фона, как следует в результате определения локализации активности указанных двух энзимов.

LOCALISATION DE L'ACTIVITÉ DE L'AMYLASE ET DE L'INVERTASE DANS LES FRACTIONS PROTÉIQUES SOLUBLES DES SEMENCES DE MAÏS

RÉSUMÉ

Les recherches ont porté sur le maïs ICAR 54, séparé en endospermes et germes. L'électrophorèse sur papier des protéines solubles des endospermes indique l'existence de 5 fractions, formées surtout par des glutélines et des globulines, qui ont été marquées par les majuscules de *A* à *E*. La zéine, soumise à l'électrophorèse en solution alcoolique, présente deux fractions. Les électrophorégrammes de l'extrait protéique des germes mettent en évidence la présence de 4 fractions, formées notamment par des globulines, qui ont été notées par les lettres allant de *a* à *d*.

L'activité de l'amylase et de l'invertase se répartit en trois fractions pour les endospermes et en deux fractions pour les germes. Pour ce qui est des endospermes, les deux enzymes sont localisées sur les fractions *A*, *B* et *E*, tandis que pour les germes, il y a une répartition différente : l'amylase est répartie sur les fractions *a* et *c* et l'invertase, sur la fraction *a* et sur la portion frontale de l'électrophorégramme respectif.

En comparant les fractions protéiques au point de vue qualitatif en raison de la valeur de la mobilité, on constate que la fraction *B* des endospermes est analogue à la fraction *a* des germes. Cette ressemblance est certainement basée sur la charge électrique des molécules, mais aussi sur l'existence d'un fond protéique commun, ainsi qu'il en a résulté lorsqu'on a établi la localisation de l'activité des deux enzymes mentionnés.

BIBLIOGRAFIE

1. R. L. MC GEACHIN, J. P. LEWIS, *Electrophoretic behaviour of serum amylase.* J. Biol. Chem., **234**, 795 (1959).
2. M. SEVELA, *Determination of transaminase activity of serum protein fractions separated by paper electrophoresis.* Nature, **181**, 915 (1958).
3. W. O. WOLFSON, *Location of alpha-2-globulin by demonstration of alkaline phosphatase during paper electrophoresis.* Nature, G. B., **180**, *4585*, 550 (1957).
4. G. PELLEGRINO, R. CARAYAGLIOS, *Studio elettroforetico delle proteine solubili della cellula epatica e di alcuni enzimi in esse contenuti.* Arch. Sci. Biol. Ital., **41**, *3*, 233 (1957).
5. D. NACHKOV, O. NACHKOVA, *Étude électrophorétique, immunologique et enzymatique des protéines hépatiques chez la souris.* Bull. Soc. Chim. Biol., **41**, *1*, 159 (1959).
6. C. ŞELARIU, S. MIHĂESCU, *Repartiţia transaminazelor pe fracţiunile electroforetice ale proteinelor solubile din mitocondriile de creier şi ficat de şobolan.* Studii şi cercet. biochimie, **5**, *1*, 97 (1962).
7. В. Л. КРЕТОВИЧ, А. А. БУНДЕЛ, С. С. МЕЛИК-САРКИСЯН, К. М. СТЕПАНОВИЧ, *О так называемых запасных белках семян.* Биохимия, **19**, 208 (1954).
8. J. F. FOSTER, J. T. YANG, N. H. YUI, *Extraction and electrophoretic analysis of the proteins of corn*, C.A., **45**, 2110 i (1951).
9. E. T. MERTZ, N. E. LLOYD, R. BRESSANI, *Studies on corn proteins. II. Electrophoretic analysis of germ and endosperm extracts.* Cereal Chem., **35**, *2*, 146 (1958).
10. V. GHEŢIE, *Mărirea capacităţii de rezoluţie electroforetică a tamponului borat prin adăugarea ionului fosfat.* Studii şi cercet. biochimie, **4**, *3*, 397 (1961).
11. Н. М. СИСАКЯН, С. С. МЕЛИК-САРКИСЯН, Е. Н. БЕЗИНГЕР, *О химических и электрохимических свойствах белков пластид.* Биохимия, **17**, 626 (1952).
12. B. L. SCALLET, *Zein solutions as association-dissociation systems.* J. Amer. Chem. Soc., **69**, 1062 (1947).
13. M. IDU, S. CÎMPEANU, *Electroforeza.* Bucureşti, Ed. medicală, 1957, 52.
14. А. ВИШНЯКОВ, Д. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, Н. ЕРМАКОВ, С. ТУКАЩИНСКИЙ, *Электрофоретическое определение фракций белка на бумаге*, ДАН СССР, **82**, 1035 (1952).
15. CH. S. HANES, *An application of the method of Hagedorn-Jensen to the determination of larger quantities of reducing sugars.* Biochem. J., **23**, 99 (1929).
16. E. M. CRAINE, K. E. FALRENHOLTZ, *The proteins in water extracts of corn.* Cereal Chem., **35**, 245 (1958).
17. E. T. MERTZ, R. BRESSANI, *Studies on corn proteins. I. A new method of extraction.* Cereal Chem., **34**, *1*, 63 (1957).
18. А. И. ОПАРИН, М. С. БАРДИНСКАЯ, *О природе и механизме действия дрожжей инвертазы.* Изд. Акад. Наук СССР, серия биологическая, *2*, 3 (1955).

INHIBAREA PRIN UREE A PEROXIDAZEI DIN FRUNZELE DE PORUMB ŞI EFECTUL PROTECTOR AL IONILOR DE CUPRU

DE

LIA ARNET

În ultimii ani, un mare număr de cercetări au avut drept scop stabilirea relaţiilor dintre microelemente şi activitatea enzimelor vegetale. S-au găsit unele corelaţii semnificative între modificarea activităţii unor enzime şi schimbarea însuşirilor biologice ale plantelor respective.

Un loc important printre lucrările de acest gen îl ocupă cele axate pe urmărirea peroxidazei din plante. Astfel A. Z. Lambin [1], introducînd în solurile de podzol compuşi de cupru, zinc, mangan, stronţiu, bor, azot, fosfor, constată o creştere a activităţii peroxidazei în plantele de ovăz, in, muştar şi, paralel, o creştere a recoltelor cu pînă la 45%. J. G. Vashenei şi V. U. Beliakova [2] adaugă în soluri nisipoase compuşi de fosfor, brom, iod, rubidiu, cobalt, mangan, cupru, zinc, găsind că în prezenţă de cupru şi zinc activitatea peroxidazei din cartofi scade. Din aceste date, ca şi din altele asemănătoare, rezultă că modificările biochimice şi cele biologice provocate în plante de către microelemente sînt variate, chiar contradictorii, în funcţie de plantă, sol, mod de administrare a microelementelor. De asemenea, se constată că toate cercetările s-au efectuat *in vivo*, urmărindu-se de fapt acţiunea indirectă exercitată asupra enzimelor de către microelemente, deoarece acestea se administrau mediului de cultură sau plantei ca atare, iar activitatea enzimatică se determina ulterior în planta astfel tratată.

În vederea cunoaşterii mai aprofundate a factorilor care pot interveni în activitatea peroxidazei vegetale, acad. E. Macovschi ne-a propus să cercetăm sub mai multe aspecte interacţiunea dintre enzima menţionată, din frunzele de porumb, şi diferite microelemente, în special ioni de cupru.

În primul rînd ne-a interesat acţiunea directă, *in vitro*, a microelementelor asupra peroxidazei din sucuri sau extracte. Totodată ne-a reţinut

atenția și un alt aspect, acel al interrelațiilor dintre microelemente și anumiți agenți denaturanți care ar acționa asupra peroxidazei vegetale. Într-adevăr, această enzimă prezintă unele particularități remarcabile în procesele de denaturare, dovedindu-se deosebit de rezistentă față de un factor inhibitor puternic cum este temperatura ridicată și avînd proprietatea ca, o dată inactivată prin fierbere, să se regenereze cu timpul [3]. Nu am găsit însă în literatură nici o dată în legătură cu comportarea ei față de un alt agent denaturant clasic — soluția concentrată de uree. O singură lucrare, efectuată de M. C. de Jaffe [4], menționează că o peroxidază animală tratată cu soluție de uree 10% nu prezintă nici o modificare în activitate. De aceea, o parte a cercetărilor noastre *in vitro* se axează pe urmărirea comportării peroxidazei vegetale în prezența soluției concentrate de uree, precum și pe evidențierea efectului eventual al microelementelor asupra acestui fenomen.

Într-o a doua fază a lucrării ne-am propus să trecem la cercetarea *in vivo* a acțiunii aceloraşi factori asupra peroxidazei din porumb, urmărind în acelaşi timp efectul lor asupra dezvoltării biologice a plantei.

În toate experiențele s-a lucrat cu plantule de porumb obținute prin însămînțarea în ghivece cu pămînt, în laborator, a semințelor de porumb din soiul ICAR 54 (15 semințe în vase de 12 — 14 cm diametru și 20—25 cm înălțime). Extractele pentru determinarea activității peroxidazice s-au preparat prin mojararea frunzelor plantulelor de 8—14 zile, cu tampon acid acetic-acetat de sodiu M/15, pH 4,7, în proporție de 1 g frunze/10 ml tampon; timpul de extracție era de 30 min și de centrifugare 10 min, la 3 000 ture/min.

Activitatea peroxidazei s-a determinat în extractele astfel obținute după micrometoda lui A. T. Ermakov și colaboratori [5], bazată pe capacitatea chinonelor de a oxida acidul ascorbic, chinonele provenind la rîndul lor din oxidarea pirocatechinei sub acțiunea peroxidazei în prezența apei oxigenate. Acidul ascorbic rămas în exces sub formă redusă s-a titrat cu o soluție de iod N/200, în prezență de amidon. Inactivarea enzimei în probele active, cît și în cele martor, s-a făcut cu o soluție concentrată de acid orto-fosforic. Menționăm că metoda propune inactivarea extractelor martor prin fierbere. Experiența noastră, cît și unele date din literatură, arată însă că timpul de fierbere necesar pentru inactivarea totală a peroxidazei vegetale variază în funcție de plantă, iar la temperatura camerei începe un proces de regenerare a activității enzimei, astfel încît datele obținute prin titrarea martorilor inactivați astfel sînt nereproductibile și greu comparabile între ele. De aceea, probele noastre martor s-au preparat prin introducerea fie în amestecul de reactivi, fie în extractul vegetal, înainte de amestecarea lor, a cantității de acid orto-fosforic necesară pentru inactivarea totală a peroxidazei.

În faza cercetărilor *in vitro* am urmărit în primul rînd acțiunea asupra activității peroxidazice din extractele de porumb a unor soluții de uree de diferite concentrații, în diferite condiții de temperatură și la perioade de contact variate între soluția de uree și extractul vegetal, procedînd astfel: s-au făcut amestecuri din 2 ml extract și 10 ml soluție de uree 5, 10, 20, 36%, la 0, 25 și 40° C, și s-au lăsat timp

de 1—30 min. Li s-au adăugat apoi cîte 4 ml amestec reactivi în proporţiile indicate de metodă. Probele s-au inactivat cu cîte 1,5 ml acid orto-fosforic de concentraţie 10% după 3 min şi s-au titrat cu soluţie de iod N/200, în prezenţă de amidon. Paralel s-a urmărit reacţia enzimatică în probe ce conţineau apă distilată în loc de uree. S-a comparat cu probe martor cuprinzînd fie uree, fie apă distilată, dar inactivate cu acid orto-fosforic înainte de amestecarea soluţiei de enzimă cu reactivii.

Datele obţinute (tabelele 1 şi 2) arată că soluţia de uree 36% (6 M) are un efect puternic inhibitor asupra peroxidazei din porumb, deşi inactivarea enzimei nu este totală. Acest efect este independent de timpul de contact între uree şi enzimă, precum şi de temperatura la care are loc acest contact. Efectul inhibitor este mai slab la concentraţii mai scăzute de uree, constatîndu-se o proporţionalitate remarcabilă între concentraţia soluţiei de uree şi gradul de inhibiţie al enzimei.

Tabela 1

Activitatea peroxidazei (p) din extractele de porumb în prezenţa soluţiei de uree 36% (u), respectiv a apei distilate (a) la diferite temperaturi

(Rezultatele sînt exprimate în ml soluţie de iod N/200)

Timp de reacţie min	(p+u) 40°C	(p+a) 40°C	(p+u) 25°C	(p+a) 25°C	(p+u) 5°C	(p+a) 5°C
0	2,38	2,46	2,40	2,42	2,36	2,20
3	1,80	0,08	1,90	0,08	2,07	0,38

Tabela 2

Activitatea peroxidazei din extractele de porumb în prezenţa soluţiei de uree de diferite concentraţii T = 25°C

(Rezultatele sînt exprimate în ml soluţie de iod N/200)

Timp de reacţie min	Soluţii de uree				
	36%	20%	10%	5%	0%
0	3,06	3,00	3,00	3,04	3,00
3	2,51	2,01	1,87	1,41	0,35

O dată stabilit astfel efectul inhibitor al ureei asupra peroxidazei din porumb, am urmărit influenţa pe care o exercită asupra aceleiaşi enzime, din extracte preparate la fel, cele mai diferite microelemente, căutînd de asemenea să stabilim dacă se poate pune în evidenţă o interacţiune între influenţa exercitată de microelemente şi cea provocată de uree. Am efectuat asemenea cercetări în prezenţă de sulfat de cupru, clorură cuprică, sulfat de zinc, sulfat de magneziu, acid boric, sulfat de mangan şi clorură de cobalt, procedînd astfel: la 2 ml extract s-au adăugat 10 ml soluţie de uree 36% sau 10 ml apă distilată. Apoi, în probele cu uree, respectiv cu apă distilată, s-au introdus cîte 0,5 ml din soluţia 0,02% a sării microelementului cercetat; într-o altă serie de probe, soluţia microelementului era înlocuită cu 0,5 ml apă distilată. Paralel s-au preparat în

același mod probe inactivate prin adaos imediat de cîte 1 ml acid orto-fosforic 10%.

Extractele astfel tratate s-au lăsat 10 min, după care s-au adăugat în toate probele cîte 4 ml din amestecul soluțiilor de reactivi. După 3 min s-a oprit reacția în probele active cu cîte 1,5 ml acid orto-fosforic 10%. Astfel, în fiecare serie de experiențe de acest gen se determina atît influența microelementului asupra reacției enzimatice ca atare, cît și acțiunea lui asupra aceleiași reacții enzimatice în prezența soluției de uree 36%.

Rezultatele obținute arată că, în condițiile noastre de lucru, prezența în mediul de reacție a ionilor metalici cercetați nu influențează activitatea peroxidazei din extractele de porumb. De asemenea, cu excepția ionului cupru, nici unul din ionii metalici experimentați nu interferează cu acțiunea inhibitorie exercitată asupra peroxidazei de soluția de uree 36%. În ceea ce privește însă ionul cupric (tabela 3), prezența lui în mediul de reacție anihilează aproape total efectul inhibitor al ureei, indiferent dacă el este introdus în extractul enzimatic înainte sau după adaosul ureei; în acest din urmă caz, efectul ionului cupric este același, independent de timpul de contact prealabil între uree și enzimă. Ionul de cupru pare deci să ocupe un loc aparte printre microelementele care ar influența activitatea peroxidazei vegetale: el exercită asupra ei, în concentrație foarte mică (0,001 M), un efect protector remarcabil față de un agent denaturant atît de puternic cum este soluția concentrată (6 M) de uree.

Tabela 3

Activitatea peroxidazei (p) din extractele de porumb în prezența soluției de sulfat de cupru 0,02% (Cu), respectiv a soluției de uree 36% (u), a amestecului soluțiilor de uree și sulfat de cupru și a apei distilate (a) T = 25°C

(Rezultatele sînt exprimate în ml soluție de iod N/200)

Timp de reacție min	p + Cu	p + u	p + Cu + u	p + a
0	3,53	3,53	3,35	3,58
3	1,51	3,17	1,63	1,52

Mai menționăm aici că am efectuat cîteva experiențe pentru a cerceta comportarea peroxidazei vegetale în prezența emulsiilor de hidrocarburi, știut fiind din lucrări anterioare [6], [7] că alte enzime, cum sînt catalaza și polifenoloxidaza, sînt inhibate puternic prin agitarea mediului de reacție cu emulsii de benzen sau toluen. Am constatat că, spre deosebire de acestea, peroxidaza din porumb nu este de loc inhibată în prezența emulsiilor. Aceasta înfățișează un alt aspect al rezistenței ei deosebite față de factorii denaturanți.

Considerînd rezultatele obținute în această primă fază de experimentare, am ales pentru cercetarea *in vivo* acei factori care s-au dovedit activi în condițiile aplicării lor directe asupra extractelor enzimatice. Astfel, am tratat semințele de porumb timp de 20 ore cu soluții de sulfat de cupru, uree + sulfat de cupru, uree și apă distilată, în următoarele

proporții: la 15 boabe de porumb cîte 10 ml apă distilată, respectiv soluție de uree 36%, la care s-a adăugat fie 1 ml soluție de sulfat de cupru 0,02%, fie 1 ml apă distilată. Boabele astfel tratate au fost semănate și s-a urmărit atît dezvoltarea plantelor, cît și nivelul activității peroxidazice în frunzele respective. S-a constatat că la semințele tratate cu soluție de sulfat de cupru și la cele martor, tratate cu apă distilată, puterea de germinare este aceeași (95—100%). Dimpotrivă, semințele tratate cu soluție de uree sau soluție de uree și sulfat de cupru au o putere de germinare foarte scăzută (6—10%). Pe cînd dezvoltarea merge normal și paralel la semințele tratate cu soluția de sulfat de cupru, respectiv cu apă distilată, ea este foarte întîrziată la cele tratate cu soluția de uree sau de uree + sulfat de cupru, primii colți răsărind la acestea cu 4—7 zile mai tîrziu.

În ceea ce privește activitatea peroxidazică în extractele preparate din frunzele astfel obținute, ea prezintă foarte mici variații individuale în funcție de plantula analizată. Media aritmetică a rezultatelor a 36 de determinări paralele dovedește însă că între frunzele plantelor ale căror semințe au fost supuse celor patru tratamente descrise nu există nici o deosebire în privința nivelului activității peroxidazei.

De asemenea s-a dovedit că efectul nociv al soluției de uree 36% asupra semințelor de porumb nu poate fi pus în legătură cu o inhibare în aceste condiții a activității peroxidazei din semințe. Într-adevăr, activitatea peroxidazică este aceeași în extractele preparate din făina obținută din boabele de porumb care au fost în contact timp de 20 ore cu soluția de uree, cît și în cele obținute din boabele de porumb tratate paralel cu apă distilată. Inhibarea puterii de germinare a semințelor de porumb înmuiate în soluții concentrate de uree se datorește probabil denaturării altor proteine, mai labile în aceste condiții de experiență.

Din cele expuse rezultă că activitatea peroxidazei din extractele frunzelor de porumb nu este influențată de prezența în mediul de reacție a microelementelor cobalt, zinc, mangan, magneziu, bor; de asemenea, acești ioni nu au acțiune asupra fenomenului de inhibare a peroxidazei vegetale de către soluțiile concentrate de uree. Dimpotrivă, ionii de cupru, deși nu influențează activitatea peroxidazei din extractele vegetale, exercită asupra enzimei un efect protector remarcabil, anihilînd practic total inhibiția ei de către uree. Aceasta evidențiază un nou aspect al caracterului reversibil al unora dintre procesele de denaturare pe care le suferă această enzimă. Totodată reiese un rol interesant pe care îl poate juca microelementul cupru, anume acela de protector sau de regenerator al activității peroxidazei inactivate prin uree. Nu este exclus ca acest efect să poată fi pus în legătură cu existența în alcătuirea cofermentului peroxidazei a ionului de fier: posibilitatea unui anumit schimb între acest ion feric și ionul de cupru adăugat în soluție ar da eventual enzimei o mai mare stabilitate față de acțiunea inhibitoare a ureei. Evident, această ipoteză rămîne de verificat prin experiențe ulterioare.

În cazul tratării semințelor de porumb cu soluții diluate de sulfat de cupru și cu soluții concentrate de uree, în prezența sau în absența

sărurilor de cupru, nu se manifestă vreo modificare la nivelul peroxidazei din semințe sau din plantulele ce provin din semințele respective. Ureea provoacă însă inhibarea puterii de germinare a semințelor, proces care nu este influențat de prezența ionului de cupru.

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
București

Prezentată la redacție la 12 octombrie 1961

ТОРМОЖЕНИЕ МОЧЕВИНОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ КУКУРУЗЫ И ПРЕДОХРАНЯЮЩИЙ ЭФФЕКТ ИОНОВ МЕДИ

РЕЗЮМЕ

In vitro, растворы мочевины тормозят активность пероксидазы экстрактов из листьев кукурузы: торможение пропорционально концентрации раствора мочевины, не зависит от температуры и продолжительности контакта между растворами мочевины и энзима. Присутствие очень малых количеств солей меди (0,001 М) практически полностью аннулирует явление торможения активности пероксидазы растворами мочевины, даже при очень высокой их концентрации (6 М). Присутствие микроэлементов кобальта, цинка, марганца, магния, бора не вызывает указанного эффекта.

In vivo, обработка семян кукурузы растворами мочевины 6 М, в присутствии или в отсутствии небольших количеств солей меди, вызывает сильное торможение способности прорастать, но не влияет на активность пероксидазы семян или растений, полученных из данных семян.

L'ACTION INHIBITRICE DE L'URÉE SUR LA PEROXYDASE DES FEUILLES DE MAÏS ET L'ÉFFET PROTECTEUR DES IONS DE CUIVRE

RÉSUMÉ

Les solutions d'urée inhibent, *in vitro*, l'activité de la peroxydase contenue dans les extraits de feuilles de maïs : l'inhibition ainsi provoquée est proportionnelle à la concentration de la solution d'urée et indépendante de la température et du temps de contact entre la solution d'urée et d'enzyme. La présence des sels de cuivre, en très faibles quantités (0,001 M) annihile pratiquement de façon totale le phénomène d'inhibition de l'activité de la peroxydase par les solutions d'urée, même à une concentration élevée (6 M). Cet effet n'a pas été constaté en présence des microéléments de cobalt, zinc, mangane, magnésium et bore.

In vivo, le traitement des semences de maïs par des solutions d'urée à 6 M, en présence ou en l'absence de petites quantités de sels de cuivre, provoque une forte inhibition de la force de germination, mais n'a pas d'influence sur l'activité de la peroxydase des semences ou des plantes qui proviennent des semences respectives.

BIBLIOGRAFIE

1. А. З. Ламбин, *Микроэлементы в жизни растений и животных*, Акад. Наук СССР, Труды конф. микроэл., 381 (1950).
2. Ж. Г. Васхеней, В. У. Белякова, *Микроэлементы в жизни растений и животных*. Акад. Наук СССР, Труды конф. микроэл., 21 (1950).
3. В. С. Тонгур, Успехи современной биологии. **XXXI**, *3*, 391 (1951).
4. M. C. de Jaffe, Rev. sanidad y asistencia social (Venezuela), **XII**, 545 (1947).
5. А. Т. Ермаков, В. В. Арасимович, М. И. Смирнова-Иконникова, И. К. Мурри, *Методы биохимического исследования растений*. Москва, 1952, 65.
6. E. Macovschi, C. Pretorian, Comunicările Acad. R.P.R., **I**, *11—12*, 1063 (1951).
7. E. Macovschi, V. Gheorghe, Buletin ştiinţific, **IV**, *3*, 473 (1952).

CERCETĂRI FIZIOLOGICE ŞI BIOCHIMICE ÎN LEGĂTURĂ CU FENOMENUL DE USCARE A STEJARULUI

DE

I. CATRINA, H. D. SCHELL, CORINA IORDACHE şi CORNELIA NIŢU

Uscarea stejarului pedunculat (*Quercus robur L.*) s-a produs în R.P.R. în mai multe perioade, începînd din anul 1910. Arborete de stejar din staţiuni şi microstaţiuni cu condiţii variate, de la productivitate scăzută pînă la cea mai înaltă productivitate, au suferit modificări profunde ale structurii în urma fenomenului de uscare, ajungîndu-se pînă la urmă la degradarea lor. O mare parte din aceste arborete a trebuit să fie exploatată înainte de împlinirea ciclului de producţie, iar altele constituie încă obiectul unor măsuri silvotehnice, speciale, în vederea ameliorării şi refacerii.

Cunoaşterea metabolismului arborilor în diferite stadii ale uscării sau în diferite condiţii ecologice constituie elementul fundamental în explicarea înlănţuirii proceselor biologice complexe care determină starea fiziologică a arborilor.

S-au făcut în paralel cercetări cu caracter fiziologic şi biochimic la arbori care au fost supuşi defolierilor naturale sau artificiale, inundaţiei sau desecării. Deşi experimentările sînt polifactoriale, s-a căutat să se realizeze şi o separare a factorilor, în vederea determinării, cu suficientă certitudine, a acţiunii factorilor singulari şi a celor asociaţi.

Pentru a obţine o imagine cît mai completă asupra proceselor fiziologice şi biochimice care au loc în procesul de uscare a stejarului, am ales o serie de determinări capabile să ne furnizeze date comparabile. În acest scop, în cadrul cercetărilor de tip fiziologic, ne-am referit la măsurarea intensităţii de respiraţie după metoda L. A. Ivanov [1], a vitezei curentului de sevă cu ajutorul izotopilor radioactivi ^{42}K şi ^{86}Rb [2], [3] şi a energiei de creştere după metoda auxometrică. În cadrul cercetărilor de tip biochimic, ne-am referit la studiul metabolismului hidraţilor de carbon cu ajutorul metodei Hagedorn-Jensen, la determinarea

fosforului total [4] şi a azotului total prin metoda Parnas-Wagner, a catalazei [4] şi a conţinutului în apă.

Determinările biochimice s-au făcut pe probe medii rezultate din frunzele luate de la vîrful ramurilor situate la diferite etaje ale coroanei arborelui bolnav sau sănătos (bază, mijloc şi vîrf). Determinările au fost repetate la interval de o lună. Rezultatele analizelor s-au raportat la 100 g substanţă uscată pentru fosfor şi azot, şi la 1 g substanţă uscată pentru hidraţii de carbon. Activitatea catalazică s-a exprimat în ml O_2.

CERCETAREA PROCESELOR FIZIOLOGICE

Intensitatea de transpiraţie. Măsurătorile de transpiraţie făcute la arbori în curs de uscare datorită cauzelor naturale, în stejărete de cîmpie (*Quercetum roboris*), arată că frunzişul arborilor cu coroana uscată în proporţie de 50% elimină cu 12—28% mai multă apă decît cel al arborilor cu coroana verde (martor). Această intensificare a transpiraţiei se datoreşte reducerii aparatului foliaceu, luminării mai intense a coroanei rămase şi activităţii susţinute a sistemului radicular.

Atunci cînd arborii în curs de uscare au frunzişul atacat de *Microsphaera abbreviata*, intensitatea de transpiraţie este cu 10—30% mai scăzută decît la arborii martori. Deci, făinarea contribuie la accentuarea slăbirii activităţii fiziologice a arborilor parţial uscaţi.

Lucrurile se petrec asemănător şi la arborii defoliaţi. După defoliere, la sfîrşitul lunii mai sau în luna iunie se formează un frunziş nou, mai sărac şi mai plăpînd decît frunzişul iniţial. Imediat după înfrunzire arborii defoliaţi au o activitate transpiratorie mai intensă decît arborii nedefoliaţi. Diferenţele variază de la cîteva procente pînă la 40%, cu tendinţă de creştere pe timp înnorat. La scurt timp după înfrunzirea arborilor care au suferit o defoliere sau două defolieri repetate, în mod sistematic apare atacul de *M. abbreviata*, care în staţiunile cu exces de umiditate este de proporţie însemnată. Determinările făcute la arborii defoliaţi în stejăretele hidrofile cu *Agrostis alba* arată că frunzişul acestor arbori, puternic atacat de făinare, are o activitate transpiratorie mult mai slabă decît cel al arborilor nedefoliaţi. Astfel, la aceşti arbori intensitatea de transpiraţie este cu 11—35% mai mică în raport cu martorul (fig. 1).

De asemenea, lujerii din a doua creştere a stejarului (iunie) sînt atacaţi uneori puternic de făinare chiar la arborii nedefoliaţi de omizi. În acest caz frunzele tinere atacate au o intensitate de transpiraţie cu 24—76% mai redusă decît cea a frunzelor verzi din prima creştere, neatacate.

Valorile intensităţii de transpiraţie variază între 600—1 000 mg/g/oră la arborii din suprafeţele desecate, inundate sau neinundate şi între 200 — 600 mg/g/oră la arborii defoliaţi din aceleaşi suprafeţe experimentale. Cele mai mici valori ale intensităţii de transpiraţie se înregistrează la lujerii din creşterea din iunie a stejarului şi sînt cuprinse între 100 — — 200 mg/g/oră.

Aşadar, distrugerea aparatului foliaceu de către omizi, asociată cu atacul intens de *M. abbreviata* la frunzişul nou format, determină reducerea transpiraţiei de 1—4 ori.

Viteza curentului de sevă. Măsurarea vitezei de ridicare a sevei s-a făcut la arbori cu coroana uscată în diferite proporţii. S-au folosit

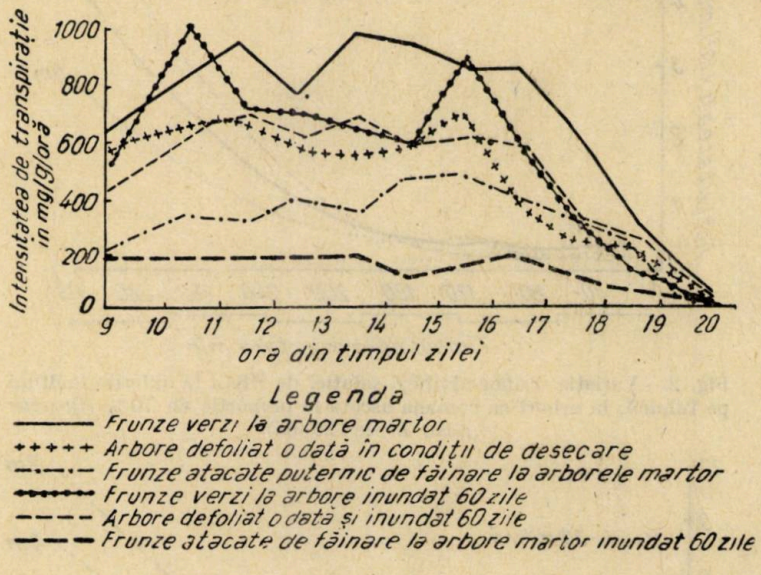


Fig. 1. — Variaţia intensităţii de transpiraţie la arborii defoliaţi şi martor, într-un stejăret cu *Agrostis alba* (păd. Noroieni, Oc. silvic Satu-Mare).

izotopii radioactivi ^{42}K şi ^{86}Rb, care s-au administrat la baza arborilor, în rădăcină, cîte 1—3 mCu la un arbore. Ridicarea izotopilor radioactivi s-a urmărit cu intensimetrul „LUCI", din metru în metru [2].

Pe baza măsurătorilor radiometrice făcute, rezultă că la arborii maturi în vîrstă de 120 ani, cu diametrul de 40—50 cm şi înălţimea de 24—28 m, viteza curentului de sevă variază în raport direct cu gradul de uscare a coroanei. Astfel, la arborii cu coroana uscată în proporţie de 70% viteza curentului ascendent este de 3,5—4 m/oră, în schimb la arborii cu coroana uscată în proporţie de 50% ea este de 7—8 m/oră, la cei cu coroana uscată în proporţie mai mică de 40% de 14—18 m/oră, iar la arborii sănătoşi de 24—30 m/oră (fig. 2 şi 3). Aceste valori sînt în concordanţă cu cele găsite de J. Kuntz [5] la *Q. ellipsoidalis* şi *Q. macrocarpa* şi cu cele menţionate de W. Klemm [3] pentru alte specii forestiere.

Difuzia tangenţială şi radială a soluţiilor de ^{42}K şi ^{86}Rb este foarte redusă în raport cu mişcarea longitudinală a sevei.

Se remarcă de asemenea o independenţă relativă în funcţiunea vaselor lemnoase (xilem). Seva circulă în fascicule lemnoase distincte şi difuzează lateral în proporţie redusă. Uscarea coroanei atrage după sine

oprirea circulaţiei sevei în vasele care aprovizionează ramurile uscate şi stagnarea activităţii rădăcinilor care corespund acestor fascicule de

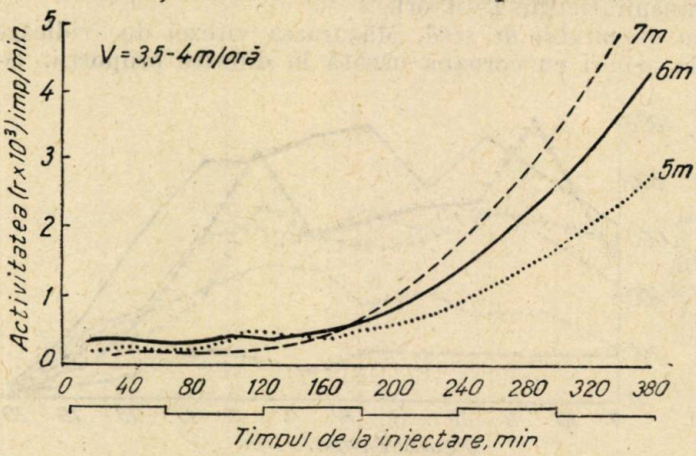


Fig. 2. — Variaţia radioactivităţii soluţiei de ^{42}KCl la diferite înălţimi pe tulpină, la arbori cu coroana uscată în proporţie de 70% (*Quercus robur L.* de 120 ani).

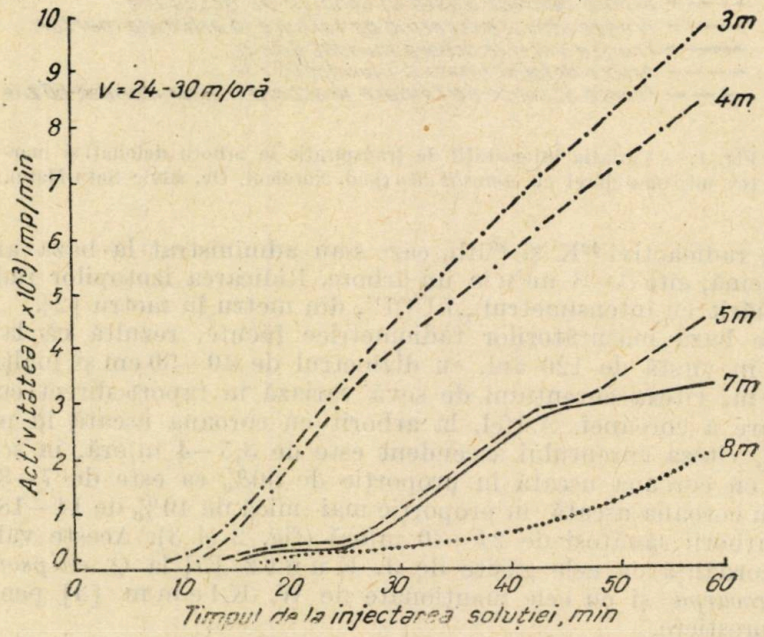


Fig. 3. — Variaţia radioactivităţii soluţiei de ^{42}KCl la diferite înălţimi pe tulpină, la arbori cu coroana verde în întregime (martor).

vase. La un arbore cu coroana uscată în proporţie de 70%, din cinci injectări cu ^{86}Rb soluţia s-a ridicat pe un singur fascicul de vase care conducea seva în ramurile verzi.

Independența relativă în funcțiunile vaselor lemnoase constituie o piedică în refacerea arborilor cu coroana parțial uscată.

Energia de creștere. Energia de creștere în grosime este rezultanta activității fiziologice a arborilor. Aceasta s-a măsurat periodic în cursul

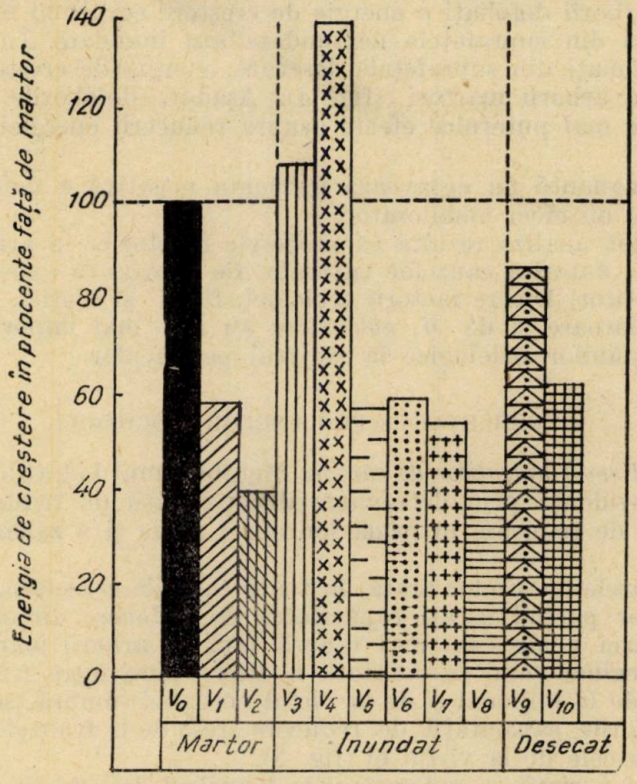


Fig. 4. — Variația energiei de creștere în grosime a stejarului pedunculat, în raport cu defolierea, inundația și desecarea (păd. Noroieni, Oc. silvic Satu-Mare).

V_0 = martor; V_1 = o singură defoliere; V_2 = două defolieri; V_3 = inundație 20 zile; V_4 = inundație 60 zile; V_5 = o defoliere și inundație 20 zile; V_6 = o defoliere și inundație 60 zile; V_7 = două defolieri și inundație 20 zile; V_8 = două defolieri și inundație 60 zile; V_9 = desecare; V_{10} = două defolieri și desecare.

sezonului de vegetație, cu ajutorul unui ceas comparator montat într-un dispozitiv cu repere.

Măsurătorile auxometrice efectuate la un număr mare de arbori din suprafețele experimentale arată că efectul cel mai puternic asupra energiei de creștere a arborilor îl au defolierile. În stejăretele cu *Agrostis alba*, după o singură defoliere creșterea în grosime se reduce la 57%, iar după două defolieri la 39% în raport cu martorul.

Asocierea defolierilor cu inundația artificială pe durate de 20—60 zile are efecte asemănătoare cu defolierea simplă. Se mai observă că, în suprafețele inundate efectele celor două defolieri repetate nu se diferen-

ţiază faţă de cele ale unei singure defolieri. De asemenea, în suprafeţele inundate dar nedefoliate, energia de creştere a înregistrat valori cu 8—39% mai mari decît la martor.

În suprafeţele în care defolierea a fost asociată cu desecarea, se remarcă la arborii defoliaţi o energie de creştere ceva mai mare decît la aceiaşi arbori din suprafeţele neinundate sau inundate. În schimb, la arborii nedefoliaţi din suprafeţele desecate, energia de creştere este mai mică decît la arborii martori (fig. 4). Aşadar, defolierile cauzate de omizi au cele mai puternice efecte asupra reducerii energiei de creştere în grosime.

Apa stagnantă nu agravează influenţa negativă a defolierilor, iar desecarea are un efect ameliorator.

În ultimă analiză rezultă că procesele fiziologice la arborii în curs de uscare, fie datorită cauzelor naturale, fie provocată experimental, se modifică simţitor. Dintre factorii ecologici, fizici şi biotici, atacurile de insecte defoliatoare şi de *M. abbreviata* au cele mai importante efecte asupra funcţiunilor fiziologice la stejarul pedunculat.

CERCETAREA PROCESELOR BIOCHIMICE

Metabolismul hidraţilor de carbon. Metabolismul hidraţilor de carbon s-a pus în evidenţă prin determinarea capacităţii de reducere directă, a capacităţii de reducere în urma hidrolizei acide şi a zaharurilor nereducătoare.

Rezultatele analizelor arată, în toate cazurile cercetate, că în frunzişul arborilor parţial uscaţi capacitatea de reducere directă şi cea în urma hidrolizei acide este mai redusă faţă de arborii martori. La arborii în întregime verzi se constată o diferenţiere între frunzele de la baza şi cele de la mijlocul şi de la vîrful coroanei (umbră, semiumbră şi lumină). Valorile capacităţii de reducere cresc de la frunzele de la baza coroanei spre cele de la vîrful ei (fig. 5).

Aceleaşi variaţii se constată şi la frunzişul de refacere al arborilor defoliaţi. Valorile capacităţii de reducere a hidraţilor de carbon sînt evident mai mici decît la arborii martori. Apa de inundaţie nu are o influenţă vizibilă asupra acestui proces la arborii defoliaţi. În schimb, la arborii martori se observă o mărire a capacităţii de reducere datorită surplusului de apă din sol. Aceste rezultate demonstrează o concordanţă deplină a metabolismului hidraţilor de carbon cu procesele de transpiraţie şi creştere. În privinţa zaharurilor nereducătoare nu se semnalează variaţii regulate şi semnificative în cazurile cercetate.

Fosforul total. Valorile obţinute pentru fosforul total, la arborii în curs de uscare şi la arborii martor, nu arată diferenţe semnificative. La arborii debilitaţi în urma defolierilor însă, frunzişul asimilează o cantitate de fosfor mai mare în raport cu martorul. Acest fapt dovedeşte că metabolismul fosforului se modifică simţitor în urma defolierilor şi cantitatea de fosfor din frunziş se măreşte.

În toate cazurile cercetate rezultă că în frunzele de la vîrful arborilor se acumulează o cantitate de fosfor mai mică decît în cele de la mijlocul

sau de la baza coroanei. Această distribuție se deosebește de datele obținute cu metoda trasorilor radioactivi. Cercetările cu ^{32}P arată, dimpotrivă, că fosforul se deplasează și se acumulează preferențial în țesuturile tinere din vîrfurile de creștere.

La arborii care vegetează pe soluri cu exces de apă, conținutul

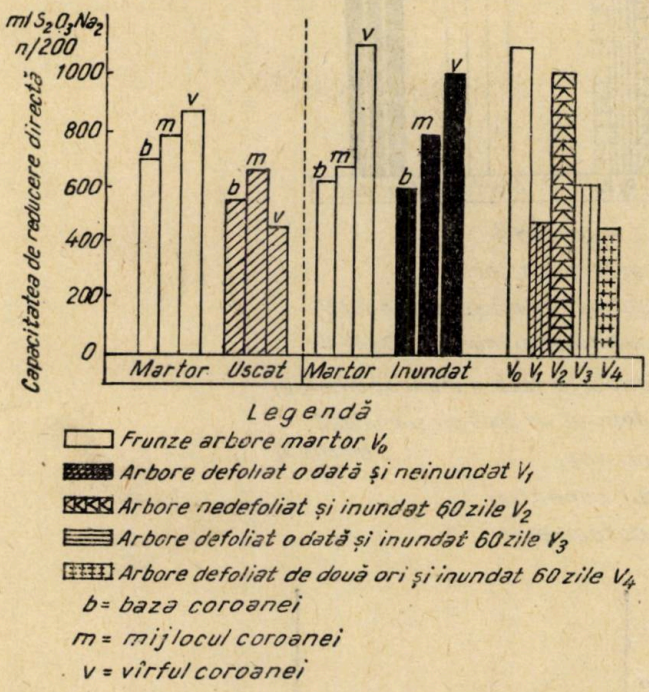


Fig. 5. — Variația capacității de reducere directă în frunze de stejar (raportat la 1 g substanță uscată).

în fosfor total din frunze este de asemenea mai scăzut în raport cu martorul (fig. 6).

Metabolismul fosforului este mai intens în perioada de creștere, la începutul sezonului de vegetație, și scade în timpul verii, cînd frunza îmbătrînește și seceta se accentuează.

Azotul total. Ca și în cazul fosforului, valorile obținute pentru azotul total nu arată deosebiri între arborii defoliați și cei nedefoliați, între arborii în curs de uscare și cei sănătoși. Totuși, din diagramele întocmite rezultă că apa din inundație are un efect negativ asupra absorbției și asimilării azotului, în special la frunzele din mijlocul și de la baza coroanei (fig. 7).

Se mai constată că în frunzișul arborilor cu coroana în întregime verde se acumulează o cantitate de azot ceva mai mare (2,82 pînă la 3,15 mg N%) decît la arborii în curs de uscare (2,88 pînă la 2,94 mg N%). Se remarcă deci un efect mai puternic al apei stagnante asupra metabo-

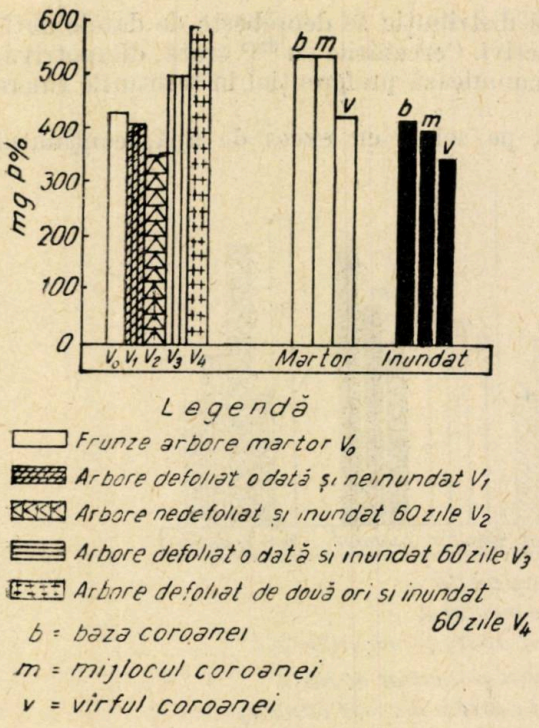


Fig. 6. — Variaţia cantităţii de fosfor în frunzele de stejar (raportat la 100 g substanţă uscată).

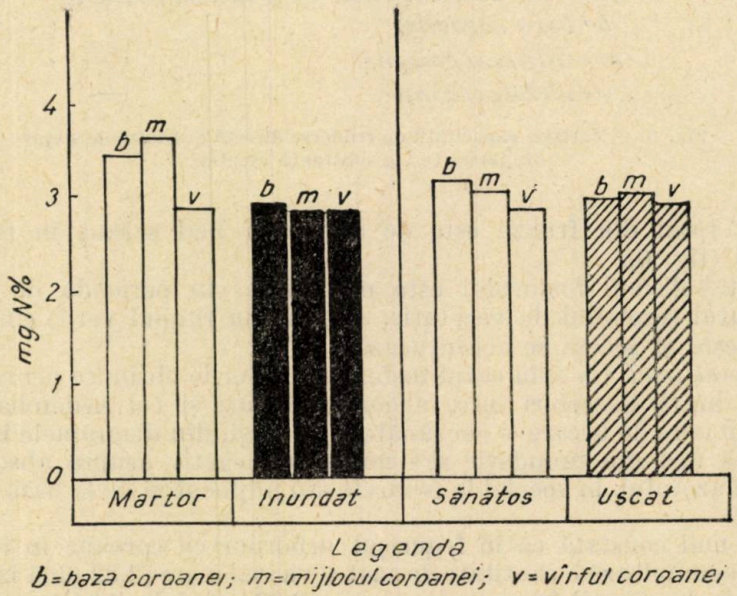


Fig. 7. —Variaţia azotului total în frunze de stejar (raportat la 100 g substanţă uscată).

lismului azotului. Pe măsură ce apa stagnează mai mult timp, în aceeași măsură nutriția cu azot a stejarului are loc în condiții mai grele. Astfel, în cazul unui stejar pedunculat ale cărui rădăcini au stat sub apă la o adîncime de 50—100 cm, din septembrie 1959 pînă la data luării probelor în iunie 1961, cantitatea de azot total găsită în frunziș a variat între 2,24 pînă la 2,51 mg N%, pe cînd la arborele martor, situat în arboretul vecin neinundat, cu solul drenat, conținutul de azot a variat între 2,73 pînă la 2,94 mg N%.

Substanța uscată și conținutul în apă. Conținutul de substanță uscată al frunzelor nu înregistrează variații între arborii parțial uscați și arborii sănătoși. Se observă numai că frunzele din vîrful coroanei au un conținut mai bogat în substanță uscată decît cele din partea de mijloc sau de bază. La vîrf conținutul în substanță uscată este de 41,2% la arborii sănătoși și 41,4% la cei parțial uscați; la mijloc 39,2% respectiv 39,6%, iar la bază 37,4% față de 37,9%.

Se mai constată o creștere a conținutului în substanță uscată în cursul sezonului de vegetație (din mai pînă în iulie) la arborii proveniți din lăstari, față de cei proveniți din sămînță. De asemenea, fertilitatea solului și regimul de umiditate influențează vizibil conținutul în substanță uscată și în apă totală. În condiții prielnice, conținutul de substanță uscată crește cu 6%, iar cel de apă scade cu 6%.

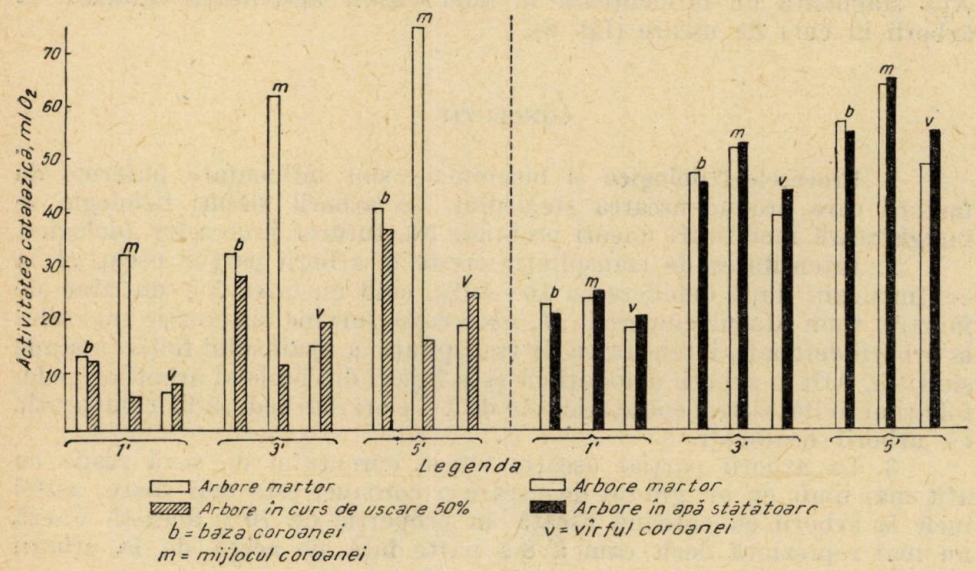


Fig. 8. — Activitatea catalazei în frunze de stejar.

Valorile găsite pentru apa totală variază între 58—62% și sînt apropiate de cele determinate pe materialul absolut proaspăt. Frunzele de la vîrf au un conținut de apă mai scăzut în comparație cu cele de la mijlocul și baza coroanei. Apa stagnantă nu are efecte vizibile asupra

substanţei uscate sau apei totale. Şi în acest caz se constată o diferenţiere între diferitele părţi ale coroanei. La vîrf conţinutul în substanţă uscată al frunzelor este de 49%, la mijloc de 46%, iar la bază de 42—46%. Conţinutul în apă totală variază invers, fiind mai mare la bază şi mai scăzut la vîrf. Această distribuţie este indiscutabil determinată de procesul de fotosinteză, a cărui intensitate este mai mare la vîrf.

Apa legată variază între 1—2%, fiind mai mare la frunzele din vîrful coroanei. Între arborii sănătoşi şi cei parţial uscaţi nu se înregistrează diferenţe.

Apa liberă are aceleaşi variaţii ca şi apa totală, numai că valorile sînt mai mici.

Activitatea catalazei. Activitatea catalazică este diferită în raport cu starea fiziologică a arborilor. Valorile obţinute arată că la arborii în curs de uscare activitatea este mult mai scăzută decît la cei sănătoşi. Se observă totodată că la arborii în curs de uscare intensitatea acestui proces este mai mică la frunzele de la vîrf şi mijloc şi mai mare la cele de la baza coroanei. La arborii sănătoşi activitatea catalazei este de asemenea mai mică la vîrf, dar foarte intensă la frunzele din partea de mijloc a coroanei şi ceva mai mare la frunzele de la bază.

Arborii crescuţi în condiţii de sol şi umiditate mai bune, au o activitate catalazică mult mai intensă decît arborii crescuţi în condiţii grele. Apa stagnantă nu influenţează în mod vizibil activitatea catalazei la arborii în curs de uscare (fig. 8).

CONCLUZII

1. Procesele fiziologice şi biochimice sînt influenţate puternic de factorii care produc uscarea stejarului. La arborii slăbiţi fiziologic se înregistrează modificări uneori profunde ale tuturor proceselor biologice.

2. Intensitatea de transpiraţie creşte la arborii parţial uscaţi şi la cei înfrunziţi după defoliere cu 10—40%, cînd nu intervine un atac de făinare. Cum atacul ciupercii *M. abbreviata* survine sistematic mai ales la arborii defoliaţi, intensitatea de transpiraţie a aparatului foliaceu scade simţitor. Atît la arborii defoliaţi cît şi la lujerii din iunie ai arborilor nedefoliaţi activitatea transpiratorie este de 1—4 ori mai redusă în comparaţie cu arborii neatacaţi.

3. La arborii parţial uscaţi, viteza curentului de sevă scade cu atît mai mult cu cît gradul de uscare a coroanei este mai mare, astfel încît la arborii cu coroana uscată în proporţie de 70% această viteză nu mai reprezintă decît cam a 8-a parte faţă de aceea de la arborii sănătoşi.

4. Energia de creştere în grosime este puternic influenţată de debilitarea arborilor prin defoliere. Defolierile puternice şi repetate reduc creşterea cu 50—60% faţă de arborii nedefoliaţi.

5. Metabolismul hidraţilor de carbon este vizibil modificat la arborii în curs de uscare şi la cei defoliaţi. Capacitatea de reducere directă scade în proporţie de 50—60% la arborii defoliaţi sau în curs de uscare,

în deplină concordanță cu scăderea energiei de creștere. Apa de inundație are o influență pozitivă asupra capacității de reducere, contribuind la mărirea acesteia. Rezultatele asemănătoare obținute asupra energiei de creștere arată că există o concordanță între cantitatea de hidrați de carbon din frunze și energia de creștere în grosime.

6. Cantitățile de fosfor și de azot total sînt influențate în mare măsură de intensitatea fotosintezei, fiind în funcție de etajul de la care s-au recoltat frunzele. Apa de inundație are un efect mult mai mic.

7. Conținutul în substanță uscată și în apă nu se modifică vizibil la arborii în curs de uscare. Aceste mărimi sînt influențate de intensitatea fotosintezei și de condițiile staționale.

8. Activitatea catalazei este mai redusă la arborii în curs de uscare decît la cei sănătoși. La arborii crescuți în condiții staționale bune, activitatea catalazică este deosebit de intensă.

Institutul de cercetări forestiere și Institutul de biochimie al Academiei R.P.R., București

Prezentată la redacție la 24 octombrie 1961

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ЯВЛЕНИЕМ ВЫСЫХАНИЯ ДУБА

РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты физиологических и биохимических исследований дубовых лесов, связанные с явлениями высыхания в РНР. Было исследовано: потение, скорость циркуляции соков, энергия роста в толщину, обмен углеводов, общее содержание фосфора и азота, содержание сухого вещества, содержание воды и активность каталазы. Полученные данные выявляют тесную связь между степенью высыхания дуба и интенсивностью физиологических процессов и, соответственно, изменением химического состава листьев данных деревьев.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Изменение интенсивности потения у лишенных листвы деревьев, по сравнению с контролем, в лесу с Agrostis alba (лес Нороени, лесной участок Сату-Маре).

Рис. 2. — Изменение радиоактивности раствора $^{42}K\,Cl$, на разных уровнях ствола, у деревьев с кроной, высохшей на 70 % (*Quercus robur L.*, стодвадцатилетний).

Рис. 3. — Изменение радиоактивности раствора $^{42}K\,Cl$ на разных уровнях ствола, у деревьев с зеленой кроной (контроль).

Рис. 4. — Изменение энергии роста в толщину стебелькового дуба в зависимости от потери листвы, наводнения и высыхания (лес Нороени, лесной участок Сату-Маре). V_0 — контроль; V_1 — однократная потеря листвы; V_2 — двукратная потеря листвы; V_3 — наводнение 20 дней; V_4 — наводнение 60 дней; V_5 — однократная потеря листвы и наводнение 20 дней; V_6 — однократная потеря листвы и наводнение 60 дней; V_7 — двукратная потеря листвы и наводнение 20 дней; V_8 — двукратная потеря листвы и наводнение 60 дней; V_9 — высыхание; V_{10} — двукратная потеря листвы и высыхание.

Рис. 5 — Изменение способности прямого восстановления в листьях дуба (отнесенное к 1 г сухого вещества).

Рис. 6. — Изменение количества фосфора в листьях дуба (отнесенное к 100 г сухого вещества).

Рис. 7. — Изменение общего количества азота в листьях дуба (отнесенное к 100 г сухого вещества)..

Рис. 8. — Активность каталазы в листьях дуба.

RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES EN RAPPORT AVEC LE PHÉNOMÈNE DE MORT DU CHÊNE

RÉSUMÉ

Les auteurs rapportent les résultats des recherches physiologiques et biochimiques entreprises dans les chênaies de la R.P.R. où l'on a constaté des phénomènes de mortalité. On a étudié la transpiration, la vitesse de circulation de la sève, l'énergie de la croissance en épaisseur, le métabolisme des hydrates de carbone, le phosphore total, l'azote total, la substance sèche, la teneur en eau et l'activité de la catalase.

Les données obtenues mettent en évidence une corrélation étroite entre le degré de dessèchement du chêne et l'intensité des processus physiologiques, respectivement la variation de la composition chimique des feuilles des arbres respectifs.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Variations de l'intensité de la transpiration chez les arbres défeuillés et chez les témoins, dans une chênaie à *Agrostis alba* (forêt de Noroieni, Canton forestier de Satu-Mare).

Fig. 2. — Variations de la radioactivité à différentes hauteurs de la tige, chez les arbres au feuillage desséché en proportion de 70 % (*Quercus robur L.* âgé de 120 ans).

Fig. 3. — Variations de la radioactivité à différentes hauteurs de la tige, chez les arbres au feuillage entièrement vert (témoin).

Fig. 4. — Variations de l'énergie de croissance en épaisseur du chêne pédonculé, en raison de la défoliation, de l'inondation et du dessèchement (forêt de Noroieni, Canton forestier de Satu-Mare).

V_0 = témoin ; V_1 = une seule défoliation ; V_2 = deux défoliations ; V_3 = inondation 20 jours durant ; V_4 = inondation 60 jours durant ; V_5 = une seule défoliation et inondation de 20 jours ; V_6 = une seule défoliation et inondation de 60 jours ; V_7 = deux défoliations et inondation de 20 jours ; V_8 = deux défoliations et inondation de 60 jours ; V_9 = dessèchement ; V_{10} = deux défoliations et dessèchement.

Fig. 5. — Variations de la capacité de réduction directe dans les feuilles de chêne (par rapport à 1 g de substance sèche).

Fig. 6. — Variations du phosphore dans les feuilles de chêne (par rapport à 100 g de substance sèche).

Fig. 7. — Variations de l'azote total dans les feuilles de chêne (par rapport à 100 g de substance sèche).

Fig. 8. — L'activité de la catalase dans les feuilles de chêne.

BIBLIOGRAFIE

1. В. Н. САУТИН, *Изучение интенсивности транспирации ранней и поздней форм дуба* (*Quercus robur L.*). Ботан. Ж. СССР, **46**, *2*, 286—290 (1961).
2. I. CATRINA, S. IONESCU, O. CONSTANTINESCU, C. HULUȚĂ, A. TOMESCU, *Cercetări cu ajutorul izotopilor radioactivi în arboretele de stejar cu fenomene de uscare din regiunea de cîmpie.* Tehnica nucleară, **4**, *1*, 45—54 (1961).
3. W. KLEMM, *Die Anwendung radioaktiver Isotope in der Forstwissenschaft.* Arch. für Forstwesen, **8**, 726 —742, 1959.
4. А. Н. ЕРМАКОВ, В. В. АРАСИМОВИЧ, М. Н. СМИРНОВА-ИКОННИКОВА, И. К. МУРРИ, *Методы биохимического исследования растений.* Москва, Сельхозгиз, 1952, 58, 488.
5. J. E. KUNTZ, A. J. RIKER., *Emploi des radioisotopes pour déterminer le rôle de la greffe des racines dans la circulation de l'eau, des aliments et des organismes pathogènes dans les arbres forestiers.* Conf. intern. sur l'utilisation de l'énergie atomique à des fins pacifiques, Geneva, **12** (1955).

INFLUENȚA COACERVATULUI SER-GUMĂ ARABICĂ ASUPRA ACTIVITĂȚII CATALAZEI HEPATICE DE CAL ȘI A CATALAZEI EXTRASE DIN GRÎU

DE

MIOARA CÂRSTEANU

Importanța studierii coacervatelor ca sisteme asemănătoare din punct de vedere fizico-chimic cu plasma celulară vie, a fost subliniată de H. G. Bungenberg de Jong [1], A. I. Oparin [2] și alții. Sub acest aspect, lămurirea relațiilor dintre coacervate și enzime pare să prezinte un interes deosebit și de aceea s-au urmărit atît influența mediului coacervatic asupra reacțiilor enzimatice ce se produc în interiorul picăturilor de coacervat sub acțiunea enzimelor incluse în acestea [3], [4], [5], [6] cît și influența picăturilor de coacervat asupra reacțiilor enzimatice care se produc în lichidul de echilibru sub acțiunea enzimelor dizolvate în el [7], [8], [9].

Dat fiind că toate aceste lucrări au fost efectuate cu coacervate obținute pe bază de substanțe proteice pure, ca de exemplu coacervatul gelatină-gumă arabică, gelatină-protamină, protamină-gumă arabică, s-a pus problema efectuării unor cercetări asemănătoare pe coacervate obținute pe bază de proteine native. Astfel, s-a arătat în lucrările precedente, că proteinele serului sangvin uman formează cu ușurință coacervate cu guma arabică [10] și că diferitele fracțiuni proteice se angajează în mod diferit în formarea acestor coacervate [11], [12].

De asemenea, s-a stabilit că unul și același ser, pe măsură ce se învechește, formează cu guma arabică coacervate ce se deosebesc unele de altele prin gradul de hidratare și alte însușiri. Aceasta dovedește că substanțele proteice din ser se schimbă în timpul păstrării acestuia, fapt care se repercutează asupra însușirilor coacervatelor respective [10]. Denaturarea termică a diferitelor fracțiuni proteice din ser face și ea ca participarea acestor fracțiuni la formarea coacervatului să difere în funcție de denaturare [13].

Deoarece pînă acum nu s-au efectuat cercetări în care să se urmărească mersul reacțiilor enzimatice în prezența unor asemenea coacervate pe bază de proteine native, acad. E. Macovschi mi-a propus să stabilesc dacă picăturile coacervatului obținut prin interacțiunea proteinelor din ser cu gumă arabică pot influența — ca și coacervatele obținute pe bază de proteine pure — activitatea enzimelor aflate în lichidul de echilibru înconjurător, de exemplu a catalazelor, și dacă această influență depinde de calitatea coacervatelor obținute de la unul și același ser după perioade diferite de păstrare.

Experiențele au fost efectuate cu o catalază de origine animală, catalaza hepatică de cal și cu o catalază vegetală, și anume cea extrasă din boabe de grîu încolțit. Catalaza hepatică de cal a fost obținută după metoda H. von Euler, K. Josephsohn [14], K. Zeile și H. Hellström [15] triturîndu-se 200 g ficat cu 200 ml apă distilată și îndepărtîndu-se hemoglobina prin precipitări repetate cu alcool și cloroform, iar catalaza vegetală a fost extrasă prin mojararea a 5 g boabe de grîu încolțit cu 1 g carbonat de calciu și 25 ml apă distilată și centrifugarea după o oră a extractului, timp de 5 min la 3 000 ture/min [16]. Pentru ca eventualele substanțe de balast conținute de extractele enzimatice brute cu care s-a lucrat să nu modifice aspectul fenomenelor cercetate, am utilizat același extract și la probele martor.

Activitatea catalazelor s-a urmărit cu ajutorul metodei manometrice. În vase Warburg se pipetau 0,15 ml ser proaspăt recoltat, 0,15 ml gumă arabică soluție 15%, 1 ml apă distilată, 0,2 ml acid acetic 2%. Formarea picăturilor de coacervat era controlată la microscop cu o mărire de 15 × 40. După formarea coacervatului se adăugau 0,4 ml soluție catalază hepatică obținută prin adaosul de 2 ml extract inițial la 1 000 ml apă distilată, respectiv 0,4 ml soluție de catalază-extract vegetal ca atare. În diverticolul vaselor Warburg se pipetau, 0,8 ml apă oxigenată $1^0/_{00}$. Volumul total de lichid din fiecare vas era de 2,7 ml. Paralel se făceau trei probe martor în aceleași condiții de pH și în aceleași proporții ca cele menționate mai sus, și care urmăreau : activitatea catalazei serice, activitatea catalazei hepatice de cal, respectiv a celei vegetale extrasă din grîu și, în sfîrșit, activitatea catalazei din serul la care s-a adăugat soluție de catalază hepatică sau vegetală. Celelalte componente erau înlocuite cu apă distilată.

Reacția era urmărită la 37°C, determinîndu-se cantitatea de oxigen degajată timp de 30 min.

Cantitatea de acid acetic adăugat amestecului ser-gumă arabică realizează un pH de 4,3—4,4. Această cantitate a fost astfel aleasă încît picăturile de coacervat să se mențină cel puțin 35 min în soluție, iar enzima să manifeste o activitate măsurabilă. Într-o lucrare anterioară [10] s-a arătat că maximum de coacervare al amestecului ser-gumă arabică se produce la pH 3,7—3,8, însă de data aceasta nu se putea lucra la acest pH deoarece inactivează în mare măsură enzima.

Totodată, menționăm că în condițiile cercetărilor noastre, soluția de gumă arabică nu modifică sensibil activitatea catalazei.

Datele obţinute sînt expuse în tabela 1.

Rezultatele obţinute arată că spre deosebire de β-amilază şi urează, care în condiţiile de lucru arătate într-o altă lucrare [7] erau absorbite din lichidul înconjurător de picăturile gata formate de coacervat gelatină-

Tabela 1

Activitatea catalazei în prezenţa picăturilor de coacervat ser-gumă arabică (μl O_2)

Timp min	Martor 1		Martor 2	Martor 3		Activitatea catalazei hepatice în prezenţa picăturilor de coacervat	Activitatea catalazei din grîu în prezenţa picăturilor de coacervat
	Activitatea catalazei hepatice	Activitatea catalazei din grîu	Activitatea catalazei serice	Activitatea catalazei serice + soluţie de catalază hepatică	Activitatea catalazei serice + soluţie de catalază din grîu		
5	39,36	26,74	33,37	54,72	65,75	64,72	74,07
10	68,63	56,52	69,43	106,19	107,69	112,65	116,84
15	82,26	67,12	103,56	132,19	129,65	137,85	141,18
20	90,84	75,70	111,94	144,66	144,29	153,66	159,72
25	93,36	81,75	120,55	158,75	159,00	161,07	172,34
30	98,40	90,84	128,09	163,08	165,03	167,99	176,65

gumă arabică, respectiv sulfat de protamină-gumă arabică, catalaza atît cea hepatică de cal, cît şi cea extrasă din grîu, nu pătrunde în interiorul picăturilor de coacervat ser-gumă arabică. Dimpotrivă, se constată o uşoară creştere a activităţii catalazei în mediul în care se află suspendate picăturile de coacervat. Interesant este şi faptul că T. N. Evreinova şi colaboratori [5] adăugînd catalază hepatică soluţiei gelatină-gumă arabică, gelatină-protamină înainte de formarea picăturilor de coacervat şi provocînd apoi formarea acestuia, a găsit că la pH 4,27 — deci la un pH foarte apropiat de cel la care lucrăm noi — practic întreaga cantitate de enzimă este înglobată de coacervat, în timp ce numai la pH 6 majoritatea catalazei este regăsită în lichidul de echilibru. Rezultă de aici că pătrunderea sau nepătrunderea unei enzime în picăturile de coacervat ulterior formării acestora, respectiv înglobarea sau neînglobarea în picăturile de coacervat în timpul formării lor, poate să depindă atît de natura coacervatului, cît şi de condiţiile în care se cercetează interacţiunea dintre coacervat şi enzimă.

Pentru a lămuri dacă diferitele modificări suferite în timp de proteinele din ser se repercutează prin intermediul coacervatelor şi asupra reacţiei enzimatice ce are loc în lichidul de echilibru înconjurător picăturilor, am efectuat o serie de determinări în care am utilizat ser provenit de la o singură recoltare. O parte din acest ser era păstrată la + 4°C şi servea la efectuarea experienţelor zilnice în care se urmărea activitatea enzimei în prezenţa picăturilor de coacervat şi activitatea catalazei serice

la care s-a adăugat soluție de catalază hepatică, respectiv soluție de catalază din grîu, în aceleași condiții de pH. Cu o a doua porțiune din ser se prepara, imediat după recoltarea lui, o soluție de coacervat și una de ser acidulat cu acid acetic pînă la pH-ul corespunzător. Ambele soluții

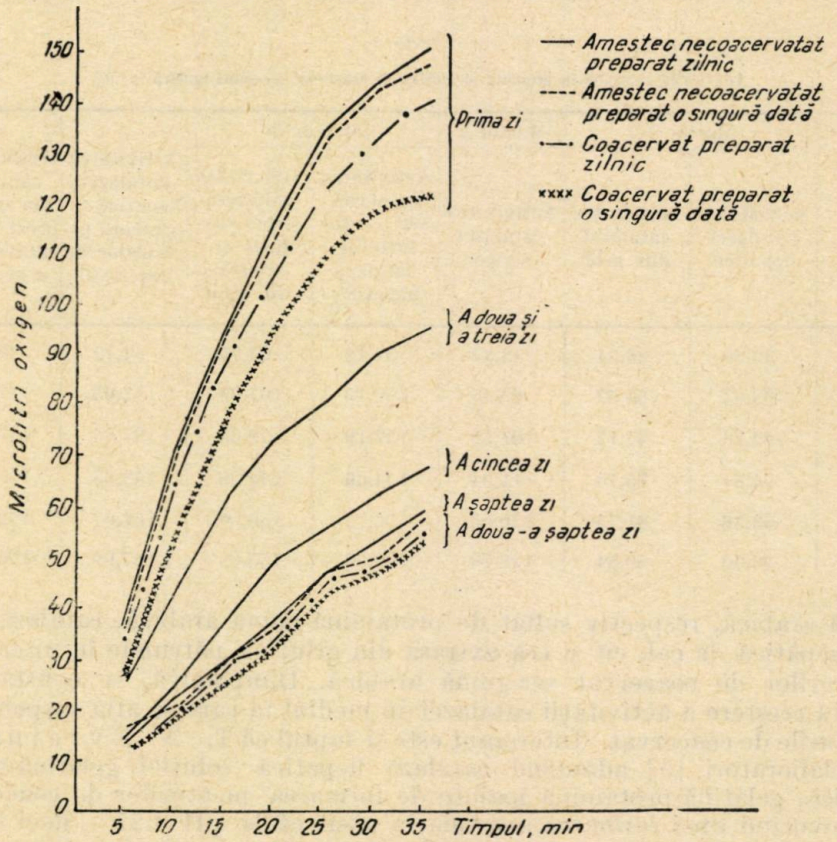


Fig. 1. — Influența modificărilor suferite în timp de proteinele serice participante la coacervatul ser-gumă arabică asupra reacției enzimatice ce are loc în lichidul de echilibru înconjurător picăturilor de coacervat.

se păstrau la +4°C și serveau la determinări zilnice ale activității catalazei adăugate probelor în momentul determinărilor.

Datele sînt expuse în figura 1.

Se constată că activitatea enzimei prezintă valorile cele mai mari în prima zi, după 5 ore de la recoltarea serului. A doua zi activitatea enzimei scade brusc în probele în care reacția se petrece în prezența picăturilor de coacervat și a serului acidulat imediat după recoltare, menținîndu-se la fel de slabă pînă în ziua a șaptea. În schimb, activitatea catalazei în probele în care serul a fost păstrat neacidulat, condițiile de pH realizîndu-se numai în momentul determinărilor, scade treptat de la ziua a doua pînă la ziua a șaptea.

Rezultă de aici că modificarea substanţelor proteice din ser se repercutează asupra activităţii catalazei. Schimbările de mediu, cum sînt scăderea pH-ului şi coacervarea, produc după 24 ore de la recoltarea serului, o accentuare a modificărilor suferite de proteinele din ser, care la rîndul lor conduc la scăderea bruscă a activităţii catalazei, scădere ce se menţine constantă în tot decursul unei experienţe, adică timp de 7 zile. Dimpotrivă, acolo unde proteinele serice nu se coacervează sau unde schimbarea de pH nu are timp să se manifeste din acest punct de vedere, denaturarea lor se produce numai progresiv cu trecerea timpului, iar ca urmare activitatea catalazei scade în acest caz treptat în decurs de 5—7 zile, ajungînd abia în ultima zi să se confunde cu activitatea enzimei din celelalte probe.

În încheiere, putem spune că în condiţiile noastre de lucru, catalaza, atît de natură animală, cît şi vegetală, nu pătrunde în picăturile coacervatului ser-gumă arabică atunci cînd enzima este adăugată mediului înconjurător picăturilor şi ulterior formării acestora. Modificările fine ce se produc la nivelul substanţelor proteice din ser influenţează activitatea catalazei, această influenţă depinzînd de calitatea coacervatelor obţinute de la unul şi acelaşi ser, după perioade diferite de păstrare.

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
Bucureşti

Prezentată la redacţie la 11 octombrie 1961

ВЛИЯНИЕ КОАЦЕРВАТА СЫВОРОТКИ С ГУММИАРАБИКОМ НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ ПЕЧЕНИ ЛОШАДИ И КАТАЛАЗЫ, ЭКСТРАГИРОВАННОЙ ИЗ ПШЕНИЦЫ

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе автор показывает, что в определенных условиях работы каталаза печени лошади, а также каталаза, экстрагированная из пшеницы, не проникает в капли коацервата, полученного взаимодействием между человеческой кровяной сывороткой и гуммиарабиком, если энзим добавляют в жидкость, окружающую капли после образования последних. В то же время было установлено, что различные изменения, которые претерпевают с течением времени сывороточные белки, отражаются через коацерваты на энзиматической реакции, протекающей в равновесной жидкости, окружающей капли коацервата. Это влияние зависит от качества коацерватов, полученных от одной и той же сыворотки, при более или менее длительном хранении.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Влияние изменений, которые претерпевают с течением времени сывороточные белки, участвующие в образовании коацервата с гуммиарабиком и сывороткой, на энзиматическую реакцию, протекающую в равновесной жидкости, окружающей капли коацервата.

L'INFLUENCE DU COACERVAT SÉRUM-GOMME ARABIQUE SUR L'ACTIVITÉ DE LA CATALASE HÉPATIQUE DU CHEVAL ET SUR L'ACTIVITÉ DE LA CATALASE DU BLÉ

RÉSUMÉ

Dans le présent travail, l'auteur montre que dans des conditions de travail données, la catalase — tant celle hépatique de cheval, que celle extraite du blé — ne pénètre pas dans les gouttelettes de coacervat obtenu par l'interaction du sérum sanguin humain et de la gomme arabique, alors que l'enzyme est ajouté au liquide entourant les gouttes et ultérieurement à la formation de celles-ci. En même temps, on a établi que les différentes modifications subies avec le temps par les protéines du sérum ont, par l'intermédiaire des coacervats, des répercussions sur la réaction enzymatique qui a lieu dans le liquide d'équilibre entourant les gouttelettes de coacervat. Cette influence dépend de la qualité des coacervats, obtenus d'un seul et même sérum, au bout de différentes périodes de conservation.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — L'influence des modifications, subies avec le temps, par les protéines sériques, participant au coacervat sérum-gomme arabique, sur la réaction enzymatique qui a lieu dans le liquide d'équilibre environnant les gouttelettes de coacervat.

BIBLIOGRAFIE

1. H. G. BUNGENBERG de JONG, *Die Koazervation und ihre Bedeutung für die Biologie.* Protoplasma, *15*, 156—160 (1932).
2. А. И. ОПАРИН, *Возникновение жизни на земле.* Москва-Ленинград, 1941, 1—268 p.
3. А. И. ОПАРИН, Т. Н. ЕВРЕИНОВА, Т. А. ШУБЕРТ, М. Н. НЕСТЮК, *Коацерваты и ферменты.* ДАН СССР, **104**, 581 (1955).
4. Т. Н. ЕВРЕИНОВА, Т. ШУБЕРТ, М. Н. НЕСТЮК, *Коацерваты и ферменты. Белковоуглеводны е коацерваты и α -амилаза.* ДАН СССР, **105**, 137 (1955).
5. Т. Н. ЕВРЕИНОВА, Т. И. ЛАРИОНОВА, *Белковоуглеводные коацерваты и каталаза.* ДАН СССР, **115**, 133 (1957).
6. А. И. ОПАРИН, К. Б. СЕРЕБРОВСКАЯ, *Действие рибонуклеазы, включенной в коацерватные капли.* ДАН СССР, **122**, 661 (1958).
7. E. MACOVSCHI, S. VASU, M. CÂRSTEANU, *Acţiunea ureazei şi β-amilazei asupra ureei, respectiv amidonului, în prezenţa unor coacervate gluco-proteice.* Studii şi cercet. biochimie, **I**, *4*, 297 (1958).
8. L. SOICHER, *Comportarea coacervatului gelatină-gumă arabică în prezenţa lipazei.* Studii şi cercet. biochimie, **II**, *3*, 321 (1959).
9. E. MACOVSCHI, L. ARNET, *Relaţiile dintre amilaza, lipaza şi fosfataza alcalină din serul sangvin uman şi coacervatul obţinut din acest ser cu gumă arabică.* Studii şi cercet. biochimie, **IV**, *1*, 23 (1961).
10. E. MACOVSCHI, M. CÂRSTEANU, *Coacervatul dintre proteinele serului sangvin uman şi gumă arabică.* Studii şi cercet. biochimie, **II**, *2*, 111 (1959).

11. D. MOŢET-GRIGORAŞ, *Participarea fracţiunilor proteice din serul sangvin uman normal la formarea coacervatului cu gumă arabică.* Studii şi cercet. biochimie, **II**, *2*, 181 (1959).
12. D. MOŢET-GRIGORAŞ, *Contribuţii la metoda de cercetare a coacervării proteinelor din serul sangvin uman cu gumă arabică.* Studii şi cercet. biochimie, **III**, *3*, 303 (1960).
13. D. MOŢET-GRIGORAŞ, *Coacervarea fracţiunilor proteice din serul sangvin uman denaturat prin căldură.* Studii şi cercet. biochimie, **IV**, *2*, 257 (1961).
14. H. VON EULER, K. JOSEPHSOHN, Liebig's Annalen, **452**, 174 (1927).
15. K. ZEILE, H. HELLSTRÖM, Ztschr. Physiol. Chem., **192**, 174 (1930).
16. V. ALEXANDRESCU, *Exosmoza şi activitatea catalazei în cursul iarovizării seminţelor grîului de toamnă.* Studii şi cercet. biochimie, **III**, *1*, 45 (1960).

MODIFICĂRILE BIOCHIMICE ALE BULBILOR DE CEAPĂ ÎN TIMPUL IERNII

DE

GEORGETA ENĂCHESCU, I. ŞOLDEA şi RODICA MARINESCU

Transformările care se petrec în bulbii de ceapă în timpul păstrării peste iarnă sînt determinate în primul rînd de natura componentelor chimice ale acestora. Din studiile existente [8], [12], [15], [16] rezultă că ceea ce caracterizează compoziţia chimică a cepei este conţinutul ridicat în apă (80—90%) şi scăzut în coloizi hidrofili. 70% din substanţa uscată a bulbilor de ceapă este alcătuită din zaharuri, între care predomină zaharoza. În constituţia pereţilor celulari intră relativ puţină celuloză şi cantităţi mari de hemiceluloză sau substanţe pectice care se pot solubiliza uşor. Toate aceste proprietăţi caracteristice multor organe de rezervă sînt cauza slabei rezistenţe la păstrare îndelungată a bulbilor de ceapă în condiţii de mediu obişnuite.

Din unele date ale literaturii [4], [11] rezultă că în timpul păstrării bulbilor de ceapă conţinutul în zahăr total se reduce cu 40—50%, cantitatea de zahăr reducător creşte ca urmare a intensificării activităţii invertazei [18], iar conţinutul în acid ascorbic se menţine practic neschimbat [3]. La sfîrşitul păstrării bulbilor de ceapă, activitatea catalazei creşte rapid, iar aceea a fermenţilor hidrolitici scade [10].

Cercetări asupra dependenţei dintre evoluţia compoziţiei chimice a cepei în timpul păstrării şi încolţire, scăderea în greutate sau rezistenţa la păstrare, au arătat că între conţinutul în substanţă uscată solubilă al bulbilor şi gradul lor de încolţire există o corelaţie negativă [1], [2]. Comportarea la păstrare a diferitelor soiuri de ceapă este influenţată de conţinutul în umiditate, zahăr [20] şi compuşi alilici [7], iar pierderile la păstrare sînt mai mici la soiurile la care conţinutul în apă scade mai puţin [19] sau la care raportul dintre zaharoză şi zahărul reducător are valori mai mari [9], [17], cum sînt de exemplu soiurile trienale. De asemenea, dacă soiurile de ceapă care se păstrează bine suferă modificări mari ale conţinutului în zahăr, în schimb complexul lor proteic rămîne practic neschimbat [13].

În afară de natura componentelor chimice ale bulbilor de ceapă sau de modificările acesteia, temperatura şi umiditatea aerului din mediul de păstrare au o importanţă foarte mare asupra păstrării bulbilor [4], [11], [14]. Din datele literaturii rezultă că la temperaturi cuprinse între +2 şi −2°C şi la o umiditate relativă de 70—75%, pierderile la păstrare sînt mai mici de 2% [17]. Cu cît temperatura de păstrare creşte (20—40°C), conţinutul bulbilor de ceapă în zahăr reducător scade, iar acela în zaharoză se măreşte [21]. S-a mai constatat de asemenea că, la temperatura obişnuită, dacă umiditatea atmosferică relativă este menţinută la 40—50% şi concentraţia în oxigen la 1%, păstrarea cepei se poate prelungi timp de 4 luni [6].

Cu toate aspectele multiple urmărite în lucrările de mai sus, lipsesc date cu privire la influenţa pe care o are modul de cultură al cepei asupra compoziţiei chimice a bulbilor şi evoluţiei acesteia în timpul păstrării. De asemenea, la noi în ţară nu există un studiu asupra modificărilor biochimice suferite în timpul păstrării de principalele soiuri de ceapă cultivată şi în legătură cu comportarea lor la păstrare.

La explicarea motivului pentru care bulbii de ceapă plantaţi toamna tîrziu produc de obicei mai multă sămînţă decît bulbii păstraţi peste iarnă şi plantaţi primăvara poate contribui studierea modificărilor lor biochimice, paralel cu intrarea în vegetaţie, în cazul celor două metode prin care se produce sămînţa.

Date fiind cele arătate mai sus, în lucrarea de faţă s-au urmărit, la cîteva din principalele soiuri de ceapă cultivate în ţara noastră, modificările biochimice petrecute în bulbii produşi prin diferite moduri de cultură, în condiţii de păstrare obişnuită sau plantaţi toamna tîrziu, precum şi corelaţia dintre modificările biochimice ale bulbilor şi comportarea lor la păstrare.

MATERIAL ŞI METODĂ DE LUCRU

S-a studiat în anii 1956—1959 ceapă din soiurile de Leascoviţ, de Dărăşti, de Zittau, de Tg. Frumos şi de Buzău, produsă la Staţiunea experimentală Ţigăneşti (reg. Bucureşti) a Institutului de cercetări horticole. Dintre aceste soiuri, primele trei s-au cultivat ca ceapă de arpagic, soiul de Tg. Frumos ca ceapă ceaclama (din sămînţă), iar soiul de Buzău ca ceapă de apă (din răsad).

Bulbii au fost ţinuţi din noiembrie pînă la începutul lui aprilie într-un pod acoperit cu tablă. Paralel, bulbi din soiurile de Leascoviţ şi de Tg. Frumos au fost plantaţi în cîmp, în luna noiembrie sau decembrie. Pentru diferite determinări fizice şi chimice s-au luat lunar, din fiecare soi, probe alcătuite din 10—20 bulbi, păstraţi sau plantaţi.

S-au înregistrat : procentul de bulbi încolţiţi, modificările greutăţii, iar la bulbii plantaţi, în plus, numărul şi greutatea rădăcinilor.

S-au determinat : conţinutul bulbilor în substanţă uscată totală, substanţa uscată solubilă (refractometric), zahărul total şi direct reducător (prin metoda Bertrand), aciditatea, celuloza, proteina brută şi pură (prin

metodele curente de laborator) şi acidul ascorbic (cu 2,6-diclorfenolindofenol). Dintre activităţile enzimatice s-au determinat : activitatea catalazei (manganometric), a peroxidazei (colorimetric, prin metoda purpurogalinei) şi a invertazei.

REZULTATELE OBŢINUTE ŞI INTERPRETAREA LOR

Temperatura şi umiditatea atmosferică exterioară şi din mediul de păstrare. În cei 3 ani de experimentare, temperaturile medii decadice exterioare pe perioada noiembrie-începutul lui aprilie au oscilat între −1 şi +10°C în lunile mai călduroase noiembrie şi martie, iar în celelalte luni între −6 şi +7°C.

Precipitaţiile sub formă de ploi şi zăpadă au fost mai abundente în decembrie şi ianuarie şi mai sărace în februarie.

Bulbii plantaţi au beneficiat deci din noiembrie pînă în aprilie de numeroase perioade cu temperatură suficient de ridicată pentru a permite începerea vegetaţiei, favorizată în acelaşi timp şi de umiditatea din sol.

Cît priveşte temperatura şi umiditatea din podul folosit ca spaţiu de păstrare a bulbilor, temperaturi ridicate (+8... +10°C) s-au înregistrat aici în noiembrie, februarie şi martie, iar cele mai scăzute (0..... −1°C) în decembrie (fig. 1). Temperaturile medii lunare pe toată perioada urmărită au oscilat între +1,5 şi +7°C, iar în perioada decembrie-februarie temperatura medie a fost de +3,5°C.

Umiditatea relativă a aerului din spaţiul de păstrare, cuprinsă între 50—90%, a fost mai scăzută (45—70%) în noiembrie, februarie şi martie, mai ridicată în decembrie şi ianuarie, şi a variat în general invers cu temperatura. Aşa cum rezultă din datele literaturii [4], [11], ea nu a fost suficient de scăzută pentru a împiedica timp mai îndelungat încolţirea bulbilor în acest spaţiu în care temperaturile au fost relativ ridicate.

Diferenţe mai mari între anii studiaţi, cu privire la factorii mediului de păstrare, au constat în următoarele : în anul 1956—1957 oscilaţiile de temperatură au fost mai mici pînă în februarie, cînd temperatura a crescut brusc. În acest an, în martie, precum şi în 1958—1959, s-a înregistrat cea mai mică umiditate relativă a aerului. Anii 1957—1959 s-au caracterizat prin temperaturi foarte ridicate în noiembrie (8—10°C), precum şi printr-o creştere mare şi bruscă de temperatură în februarie pentru primul an şi în martie pentru al doilea an.

Compoziţia chimică iniţială a bulbilor de ceapă. Din tabela 1, în care este redată compoziţia chimică a bulbilor de ceapă din soiurile studiate, la începutul păstrării, se constată următoarele : bulbii soiurilor de Leascoviţ, de Dărăşti şi de Zittau, proveniţi din arpagic, precum şi cei din soiul de Tg. Frumos, obţinuţi din sămînţă în primul an de cultură, au avut o compoziţie chimică asemănătoare, caracterizată în medie prin 12,4% substanţă uscată totală, 10,8% substanţă uscată solubilă, 8% zahăr total, 0,93% celuloză şi 1,60% substanţe cu azot (proteină brută). Zaharoza, formă de rezervă glucidică predominantă la ceapă, a reprezentat aproximativ 70% din zahărul total. Substanţa uscată a bulbilor

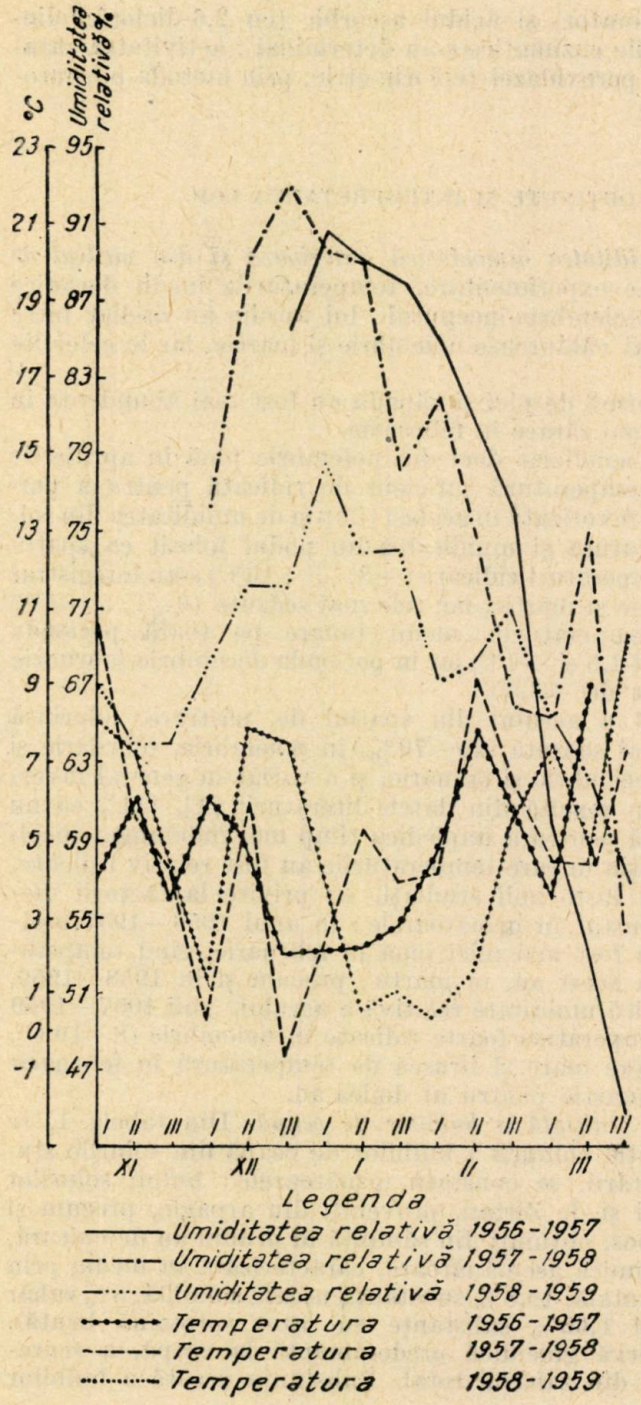


Fig. 1. — Variația temperaturilor și umidității relative pe decade, în spațiul de păstrare.

de ceapă din soiurile de mai sus a fost alcătuită în general din 65% zahăr total, 12% proteină brută şi 7,5% celuloză. Restul componentelor chimice ale substanţei uscate, în medie 12%, este format în cea mai mare parte din hemiceluloze şi substanţe pectice, nedozate în această lucrare.

Diferenţele întîlnite la bulbii din soiul de Tg. Frumos, faţă de soiurile cu bulbi proveniţi din arpagic, au constat în conţinutul mai mic în celuloză, activitatea în general mai intensă a peroxidazei şi, cu excepţia anului 1958, în conţinutul redus în substanţă uscată totală şi solubilă, zahăr, proteină brută şi pură. Bulbii soiului de Buzău, proveniţi din răsad, au avut o compoziţie chimică cu totul diferită de a celorlalte soiuri, caracterizată printr-un conţinut ridicat în apă şi, legat de acesta, prin unul scăzut în substanţă uscată şi în componentele acesteia. În bulbii soiului de Buzău s-a găsit numai 70% din conţinutul în substanţă uscată şi zahăr total al celorlalte soiuri, dar cea mai mare proporţie de zahăr reducător faţă de zahărul total (50—60%).

Modificările biochimice ale bulbilor de ceapă în timpul păstrării. În figura 2 sînt redate modificările componentelor chimice numai la bulbii de ceapă ai soiului de Leascoviţ şi de Tg. Frumos, păstraţi în pod. Se constată scăderea continuă a conţinutului în substanţă uscată al bulbilor de ceapă, precum şi creşterea la începutul păstrării şi apoi micşorarea proporţiei de zahăr total din substanţa uscată, ceea ce, după cum se ştie, este în cea mai mare parte consecinţa consumării zaharurilor prin respiraţie. Conţinutul în zahăr reducător, exprimat în procente faţă de substanţa uscată a crescut continuu, cu o viteză mai mică însă către sfîrşitul păstrării, datorită în cea mai mare măsură intensificării respiraţiei. Cantitatea de zahăr direct reducător, raportată la zahărul total, a fost mai mare la sfîrşit faţă de începutul păstrării, ceea ce arată că în general viteza învertirii zaharozei a fost mai mare decît aceea a consumului de zahăr reducător. Existenţa unor rezerve mai importante de zaharuri simple în bulbii păstraţi este necesară desigur pentru a permite creşterea cît mai rapidă a mugurilor, cînd condiţiile de mediu devin favorabile pentru aceasta.

Aciditatea bulbilor de ceapă a crescut pînă în apropierea sfîrşitului păstrării şi apoi a scăzut. Creşterea acidităţii arată că atît timp cît bulbii sînt în repaus sau în stare de vegetaţie lentă, acizii organici sînt puţin folosiţi în respiraţie sau în sinteze de noi substanţe.

Cît priveşte evoluţia conţinutului în celuloză al bulbilor de ceapă, în prima parte a perioadei de păstrare proporţia de celuloză din substanţa uscată a crescut, pentru ca apoi să scadă.

Conţinutul în substanţe cu azot (proteină brută) nu a variat prea mult în cursul păstrării bulbilor, dar a prezentat uşoare creşteri la sfîrşitul păstrării, datorită probabil folosirii masive în această perioadă a celorlalte categorii de substanţe de rezervă, pentru creşterea mugurilor. Conţinutul în proteină pură al bulbilor a crescut uşor în tot timpul păstrării, determinînd o mărire a proporţiei acestei componente faţă de totalul substanţelor cu azot. Aceasta se datoreşte probabil fie unui consum mai mare de substanţe cu azot neproteic faţă de cele cu azot proteic, fie formării de noi aminoacizi legaţi apoi în proteine.

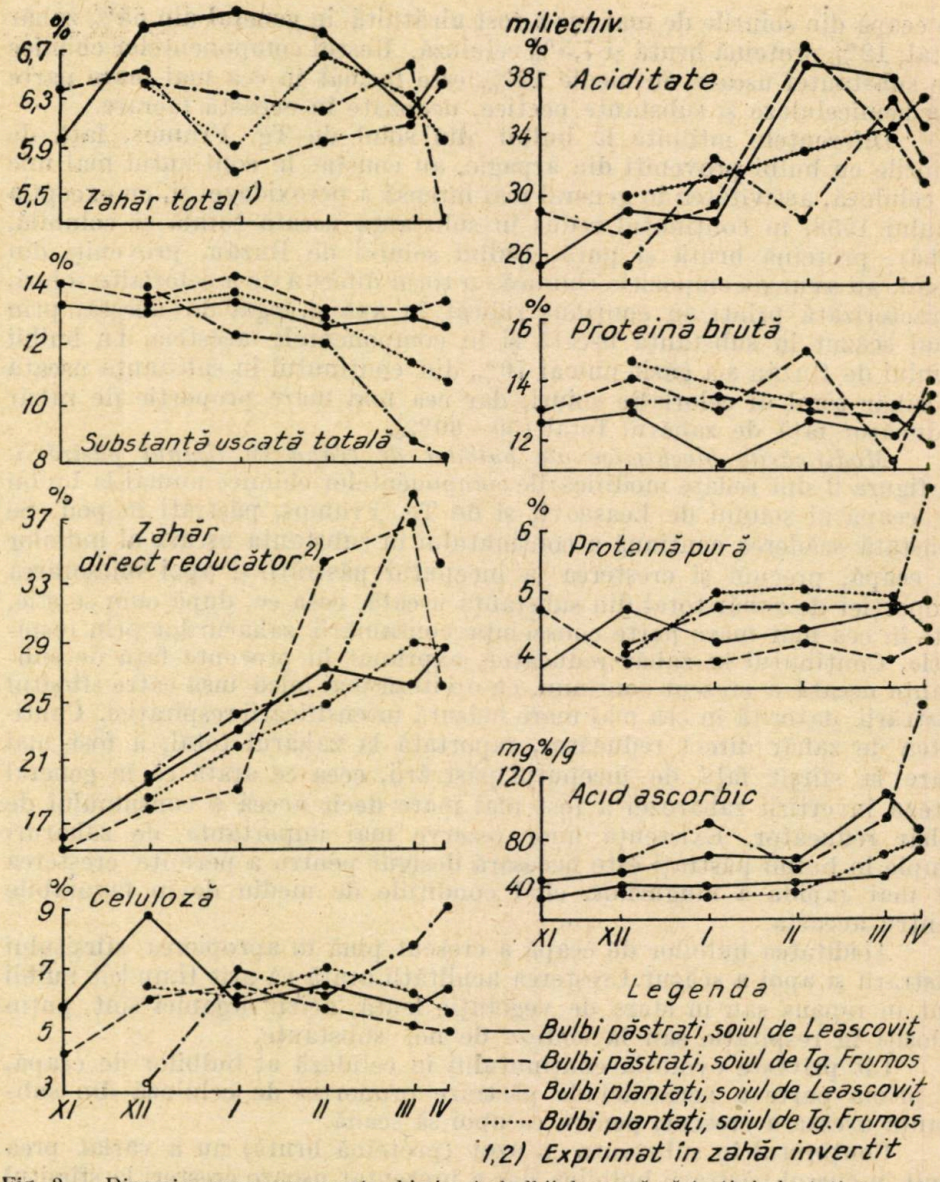


Fig. 2. — Dinamica unor componente chimice în bulbii de ceapă păstrați și plantați (raportate la substanța uscată).

Conținutul în acid ascorbic a crescut continuu în timpul păstrării bulbilor, ceea ce arată că procesele oxido-reducătoare, care se intensifică o dată cu acelea de hidroliză cînd temperatura crește, folosesc în mare măsură acidul ascorbic.

Activitatea invertazei (fig. 3) s-a intensificat de asemenea pe măsura creșterii temperaturii în mediul de păstrare, respectiv pe măsura ieșirii din repaus a bulbilor, fapt care este în concordanță cu creșterea continuă a conținutului în zahăr reducător al acestora. Catalaza (fig. 3) de asemenea a prezentat o intensificare puternică a activității în ultima etapă a păstrării. Cît despre peroxidază (fig. 3), activitatea acestei enzime a fost destul de pronunțată uneori la începutul păstrării, pentru ca ulterior să scadă și apoi să se intensifice la sfîrșitul păstrării, ca și în cazul celorlalte enzime.

Măsura în care compoziția chimică a bulbilor păstrați sau plantați s-a modificat în timpul iernii rezultă din cifrele tabelei 2, care reprezintă pentru componentele chimice urmărite, diferența % între conținuturile procentuale de la începutul și sfîrșitul analizelor.

În ceea ce privește influența soiului sau a modului de producere a bulbilor asupra modificării compoziției chimice a acestora în timpul păstrării, diferențele cele mai mari s-au înregistrat la soiul de Buzău (din răsad). La acest soi, ai cărui bulbi s-au caracterizat la începutul păstrării (tabela 1) printr-un conținut mai mare în apă, cu o proporție mai ridicată de zahăr reducător față de zahărul total, s-au înregistrat modificări mai mari ale compoziției chimice (tabela 2) comparativ cu celelalte soiuri.

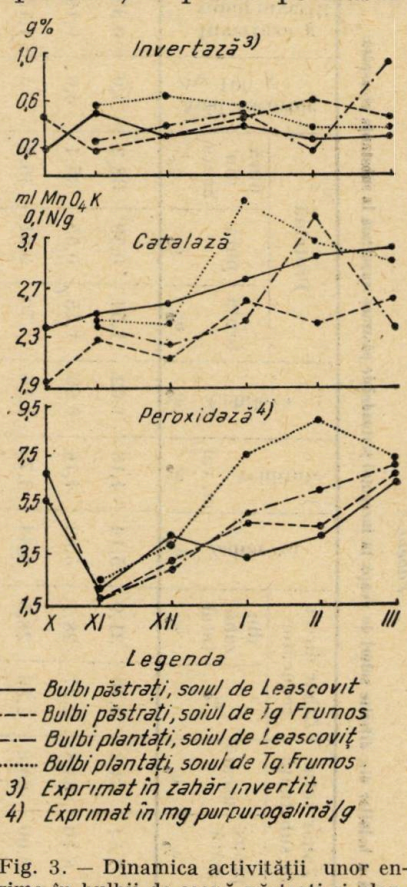


Fig. 3. — Dinamica activității unor enzime în bulbii de ceapă păstrați și plantați (raportate la substanța proaspătă).

Soiul de Leascoviț a prezentat modificări mai mici ale substanței uscate și zahărului total din bulbi față de celelalte soiuri. În bulbii soiurilor de Dărăști și de Zittau s-a acumulat la sfîrșitul păstrării mai mult zahăr reducător și acid ascorbic, asemănător soiului de Buzău (tabela 2).

Modificările compoziției chimice a bulbilor de ceapă plantați toamna tîrziu (fig. 2 și 3). Așa cum s-a arătat mai înainte, bulbii plantați au beneficiat de numeroase perioade cu temperaturi destul de ridicate, care, asociate cu umiditatea solului, au permis declanșarea hidrolizei substanțelor de rezervă și începerea vegetației încă din timpul iernii. Într-adevăr, după cum reiese

Tabela 1

Compoziția chimică a bulbilor din diferite soiuri de ceapă la începutul perioadei de păstrare (raportată la substanța proaspătă)

Soiul	Anul	Substanță uscată		Zahăr total în substanță		Zahăr direct reducător		Zaharoză	Aciditate	Celuloză	Proteină			Acid ascorbic mg/100 g	Invertază g zahăr invertit	Catalază ml $KMnO_4$ 0,1 N/g	Peroxidază mg purpuro-galină/g
		totală	solubilă	proaspătă	uscată	%	din zahăr total		m. val.		brută	pură	pură din brută				
		%	%	%	%		%	%	%	%	%	%	%		%		
De Leascoviț	1956	12,04	11,0	7,54	63,3	2,40	31,9	5,14	4,18	1,02	1,54	0,59	38,3	3,0	0,37	2,77	2,79
	1957	12,69	10,5	8,10	63,8	2,27	28,1	5,83	4,16	0,90	1,55	0,55	35,4	6,0	0,19	2,37	5,92
	1958	12,92	11,6	9,00	69,6	2,56	28,5	6,44	3,76	1,16	1,70	0,61	35,8	7,5	1,13	3,75	—
De Tg. Frumos	1956	11,10	9,5	6,80	61,2	3,23	47,5	3,57	4,18	0,77	1,47	0,42	28,5	3,0	0,32	2,93	1,84
	1957	11,30	10,5	7,40	65,4	1,95	26,4	5,45	3,50	0,88	1,33	0,50	37,5	6,1	0,39	1,96	7,13
	1958	14,00	12,7	8,92	63,6	2,10	23,6	6,82	4,18	0,60	1,81	0,68	32,0	6,1	0,55	3,13	3,53
De Dărăști	1956	12,11	9,6	7,64	63,0	2,50	32,8	5,14	4,30	0,91	1,69	0,47	27,8	3,0	0,42	2,69	1,58
	1957	13,31	12,2	7,44	55,8	1,80	24,2	5,64	3,94	0,91	1,62	0,57	35,1	4,4	0,31	2,74	6,31
De Zittau	1956	12,08	9,7	8,35	69,1	1,70	20,4	6,65	4,18	1,18	1,72	0,46	26,7	3,2	0,41	3,27	1,76
	1957	12,58	11,0	8,82	70,1	1,54	17,5	7,28	3,50	0,99	—	0,49	—	5,5	0,52	2,46	4,08
De Buzău	1957	8,70	8,5	4,56	52,4	2,20	51,7	2,36	3,28	0,82	—	0,54	—	4,6	0,32	2,07	3,57
	1958	8,84	8,0	5,47	61,8	3,50	64,0	1,97	2,93	0,52	1,34	0,46	34,3	6,1	1,35	2,60	3,56

Tabela 2

Diferențele % între conținutul procentual inițial și final al componentelor chimice, în bulbii păstrați și plantați

Soiul		Anul	Substanța uscată totală	Substanța uscată solubilă	Zahăr total	Zahăr direct reducător din zahăr total	Proteină pură din proteină brută	Acid ascorbic
De Leascoviț	păstrare	1956 | 1957	— 4	—	—12	+23	+ 2	+313
		1957—1958	— 7	—	—21	+16	+ 4	+ 46
		1958—1959	—7	— 6	— 9	+17	+ 8	+ 76
	plantare *)	1956—1957	—22	—39	—49	+37	+ 5	+ 75
		1957—1958	—47	—72	—68	+56	+22	+ 91
		1958—1959	—41	—49	—56	+41	+26	+117
De Tg. Frumos	păstrare	1956—1957	— 8	—	—11	+22	+ 4	+423
		1957—1958	—10	—16	—25	+20	+ 3	+ 40
		1958—1959	— 7	— 5	—11	+15	+ 6	+ 67
	plantare *)	1956—1957	—10	—42	—36	+35	+ 3	+104
		1957—1958	—45	—60	—55	+50	+11	+ 40
		1958—1959	—24	—24	—29	+23	+ 6	+ 33
De Dărăști	păstrare	1956—1957	— 9	— 4	—23	+30	+17	+250
		1957—1958	—11	—14	— 5	+24	+ 1	+104
De Zittau	"	1956—1957	—11	—15	—31	+35	+14	+271
		1957—1958	— 7	— 9	—12	+36	—	+110
De Buzău	"	1957—1958	—22	—25	—18	+33	+ 9	+180
		1958—1959	—18	—16	—31	+21	+ 6	+ 82

*) Perioada urmărită a fost cu 20—40 zile mai scurtă decît la bulbii păstrați.

din figura 2, îmbogățirea cu apă a bulbilor de ceapă, mai puternică o dată cu ridicarea de temperatură din februarie și martie, a dus la scăderi ale substanței uscate și zahărului total, cu mult mai mari decît în cazul bulbilor păstrați din aceleași soiuri, și anume cu 10—47%, respectiv 30—68% după 80—120 zile de la plantare (tabela 2).

Proporția de zahăr reducător față de zahărul total a crescut în bulbii plantați cu 23—56% la ultimele analize, adică de asemenea mai mult decît la bulbii păstrați. Conținutul în celuloză a fost și el în general mai ridicat, mai ales în ultima perioadă, fapt explicabil prin consumul

mult mai mare de zaharuri în bulbii plantați. Conținutul în proteină pură a crescut mult la bulbii plantați, și anume în așa măsură încît proporția de proteină față de totalul substanțelor cu azot a sporit cu 3—26% (tabela 2).

În ceea ce privește activitatea enzimatică, așa cum era de așteptat, atît invertaza cît și catalaza și peroxidaza au activat mult mai intens în bulbii plantați.

Diferențele dintre cele două soiuri urmărite au constat în general în scăderea mai mare a conținutului în substanță uscată și zahăr și în acumulările mai mari de zahăr direct reducător, acid ascorbic și proteină pură la soiul de Leascoviț (tabela 2).

Aceasta poate să fie o consecință a particularității soiului respectiv sau a faptului că, în general, în bulbii formați 2 ani, cum a fost cazul la acest soi, procesele biochimice sînt mai intense decît în bulbii de 1 an, cum sînt aceia ai soiului de Tg. Frumos.

Comparație între modificările biochimice ale bulbilor păstrați sau plantați în diferiți ani. Evoluția compoziției chimice a bulbilor de ceapă păstrați sau plantați într-un an este determinată desigur, în primul rînd, de însușirile fiziologice, fizice și chimice inițiale ale soiurilor și, apoi, de factorii de mediu. În 1956—1957, așa cum rezultă din tabela 1, la toate soiurile s-a găsit mai puțină substanță uscată și mai puțin zahăr și acid ascorbic, o activitate peroxidazică mai slabă și o proporție mai mare de zahăr reducător față de zahărul total. În 1958—1959 bulbii au fost însă mai bogați în substanță uscată, zahăr, acid ascorbic și proteină brută. În 1957—1958 compoziția chimică a bulbilor nu s-a remarcat față de ceilalți ani decît prin conținutul mai redus în zahăr reducător, activitatea mai slabă a catalazei și mai intensă a peroxidazei. În general, nivelul inițial ridicat sau scăzut al componentelor dozate s-a menținut ca atare în cursul dinamicii urmărite.

Sensul sau ritmul modificărilor însă nu au fost influențate de valorile conținutului inițial. A făcut excepție activitatea invertazei, care a suferit modificări mult mai mari în 1958—1959, cînd și activitatea inițială a fost mai mare, precum și conținutul în acid ascorbic al bulbilor de ceapă, care a crescut mai mult în 1956—1957, cînd soiurile au fost mai sărace în această vitamină.

Componentele chimice ale căror dinamici au diferit foarte mult de la an la an au fost aciditatea și enzimele.

Comparînd curbele care reprezintă dinamica activității invertazei în anii experimentărilor (fig. 4), pe soiuri, se constată, ca și în cazul altor componente chimice, că soiuri diferite s-au comportat mai asemănător în același an, decît același soi în ani diferiți. Acest fapt arată cît de mare importanță pot avea asupra proceselor biochimice din bulbi condițiile anului de cultură și acelea ale mediului de păstrare. Ca exemplu se mai poate da creșterea conținutului în substanță uscată și a tuturor componentelor ei (raportate la substanța proaspătă) la bulbii păstrați din diferitele soiuri, constatată la sfîrșitul analizelor în 1956—1957 și datorată desigur pierderii mari de apă din bulbi, o dată cu trecerea bruscă la temperaturile ridicate din februarie.

Privitor la influența mediului de păstrare asupra modificării compoziției chimice a bulbilor se poate presupune că scăderile mari de substanță

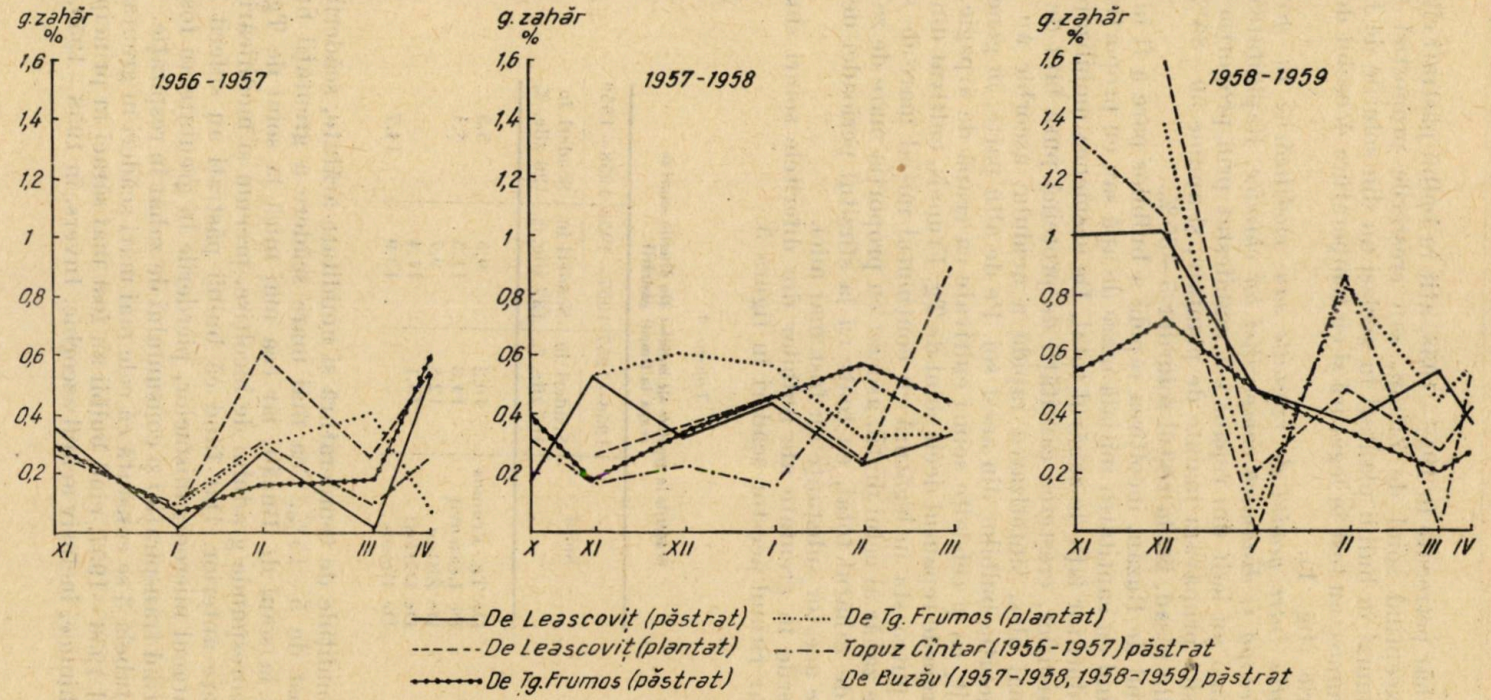


Fig. 4. — Dinamica activității invertazei în bulbii păstrați și plantați.

uscată și zahăr petrecute în 1957—1958, atît în bulbii păstrați cît și în cei plantați, exceptînd soiul de Zittau, sau creșterile proporției de zahăr reducător numai în bulbii plantați în același an din soiurile de Leascoviț și de Tg. Frumos, au fost în legătură și cu temperatura deosebit de ridicată din februarie (fig. 1).

Corelația între gradul de vegetație sau modificările în greutate ale bulbilor de ceapă și dinamica compoziției lor chimice. Rapiditatea cu care bulbii păstrați au ieșit din repaus s-a manifestat prin proporția de bulbi încolțiți găsită primăvara înainte de plantare, și anume 50—85% la soiul de Buzău din răsad, iar la restul soiurilor 5—35%.

La soiul de Buzău, încolțirea rapidă a bulbilor pare a fi în legătură în primul rînd cu cantitatea inițială mare de apă sau cu proporția ridicată de zahăr reducător față de zahărul total. De asemenea mobilizarea puternică a zaharurilor, creșterea cantității de proteină pură față de proteina brută și, mai ales, sintetizarea rapidă a acidului ascorbic au favorizat desigur vegetația bulbilor din acest soi. Pe de altă parte, în general, soiul de Leascoviț, ca și celelalte soiuri cultivate ca ceapă de arpagic, și-a terminat mai repede repausul decît soiul de Tg. Frumos, cultivat din sămînță, ceea ce ar putea sta în legătură cu conținutul inițial mare de substanță uscată și de zahăr al celui dintîi, asociat cu proporția mare de zahăr reducător față de zahărul total, cu toate că la sfîrșitul perioadei de păstrare modificările acestor substanțe au fost mai mici.

Scăderile în greutate ale bulbilor din diferitele soiuri sînt date în tabela 3, iar ritmul acestor scăderi în figura 5.

Tabela 3

Scăderile în greutate ale bulbilor din diferite soiuri de ceapă în timpul păstrării

Soiul	1956—1957	1957—1958	1958—1959
	Scăderi în 107 zile, %	Scăderi în 137 zile, %	Scăderi în 126 zile, %
De Tg. Frumos	10,2	9,5	5,5
De Leascoviț	14,3	11,5	8,4
De Zittau	12,8	9,7	—
De Dărăști	15,1	11,4	—
De Buzău	—	13,9	14,7

În condițiile de temperatură și umiditate arătate, scăderile în greutate au fost de 5—15%. Cea mai mare scădere a greutății bulbilor s-a înregistrat la soiul de Buzău, iar cea mai mică la soiul de Tg. Frumos, fapt care corespunde gradului de încolțire, precum și modificărilor biochimice arătate anterior. Dat fiind că bulbii păstrați au suferit în general puțin de atacul microorganismelor, pierderile în greutate au fost datorate în primul rînd transpirației și consumului de zahăr în respirație.

Din tabela 3 se constată că cele mai mari scăderi în greutate au avut loc în anul 1956—1957, cînd bulbii au fost mai săraci în principalele componente chimice, inclusiv acidul ascorbic. Invers, în 1958—1959, exceptînd

soiul de Buzău, bulbii, avînd după cum s-a văzut un conținut mai ridicat în principalele componente chimice, au pierdut mai puțin din greutate.

Ținînd seama că scăderea în greutate a bulbilor păstrați se datorează în primul rînd pierderii de apă, și presupunînd că în țesuturile mai bogate

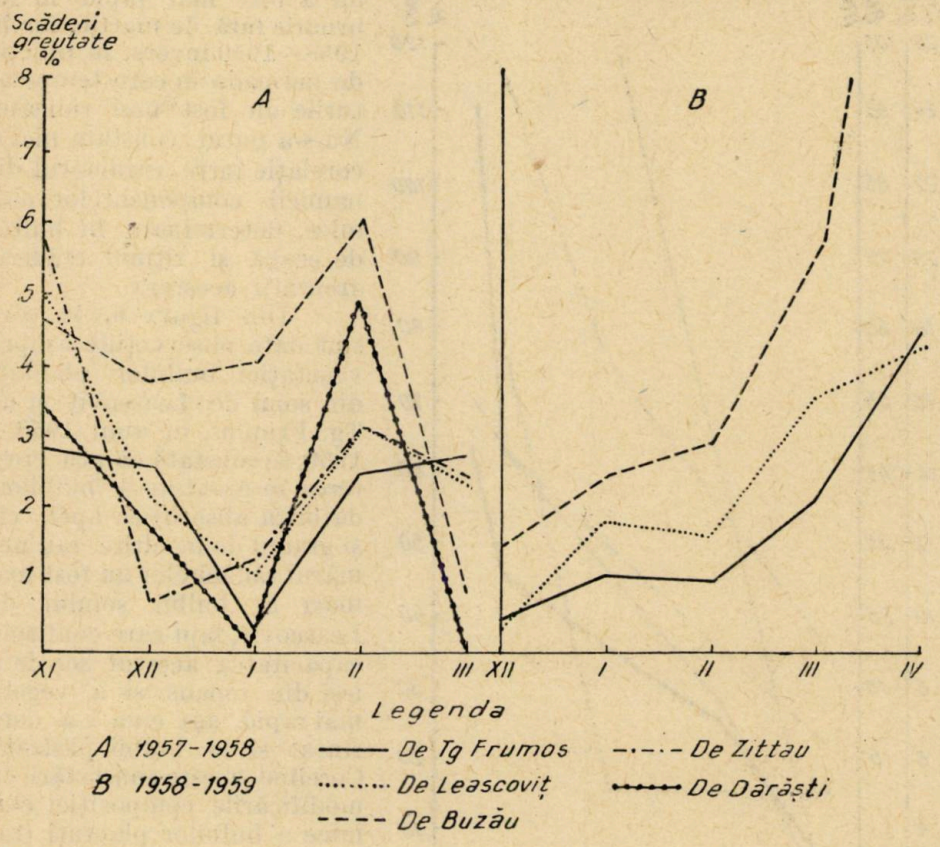


Fig. 5. — Ritmul scăderii în greutate a bulbilor de ceapă.

în substanță uscată există în cantități mai mari și substanțe macromoleculare hidrofile, care reține mai puternic apa în celule, atît cele spuse mai sus cît și pierderile mari în greutate suferite de soiul de Buzău, cu bulbii deosebit de bogați în apă, sînt explicabile. Pierderile mari de apă ale bulbilor în 1956—1957 se pot datora dezechilibrului provocat de creșterea bruscă a temperaturii în februarie.

Din figura 5 se constată că ritmul scăderii în greutate a bulbilor, mai lent la soiul de Tg. Frumos și mai rapid la soiul de Buzău, a fost mult deosebit în anul 1957—1958 față de anul 1958—1959. Aceasta s-a datorat probabil și faptului că umiditatea din spațiul de păstrare a fost mult mai mică în 1958—1959. Viteza cea mai mică a pierderilor în greutate a cores-

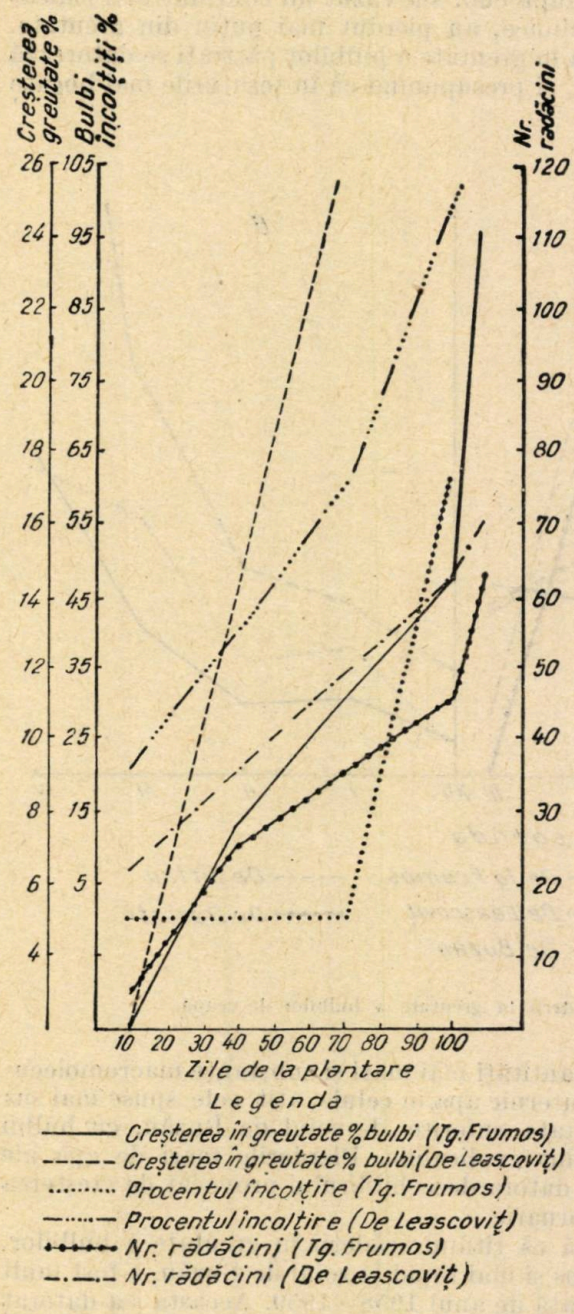


Fig. 6. — Creşterea în greutate, procentul de încolţire şi numărul rădăcinilor la bulbii plantaţi în 1958—1959.

puns lunilor decembrie sau ianuarie, cînd şi temperaturile au fost mai mici. În 1957—1958 ritmul pierderilor a fost mai rapid în februarie faţă de martie, iar în 1958—1959 invers, în funcţie de perioada în care temperaturile au fost mai ridicate. Nu s-a putut constata nici o corelaţie între caracterul dinamicii componentelor chimice determinate în bulbii de ceapă şi ritmul scăderii greutăţii acestora.

Din figura 6, în care sînt date observaţiile asupra vegetaţiei bulbilor plantaţi din soiul de Leascoviţ şi de Tg. Frumos, în anul 1958—1959, se constată că atît creşterea în greutate a bulbilor, datorită absorbţiei apei, cît şi gradul de încolţire sau numărul rădăcinilor au fost mai mari la bulbii soiului de Leascoviţ, fapt care confirmă capacitatea acestui soi de a ieşi din repaus şi a vegeta mai rapid, aşa cum s-a constatat şi la bulbii păstraţi. Corelînd aceste constatări cu modificările compoziţiei chimice a bulbilor plantaţi (tabela 2), rezultă concordanţa între vegetaţia mai timpurie şi mai puternică a bulbilor plantaţi din soiul de Leascoviţ şi intensitatea modificării compoziţiei lor chimice, faţă de bulbii din soiul de Tg. Frumos. Astfel, consumul de substanţă uscată totală şi solubilă, consumul de zahăr total, creşterea proporţiei de zahăr direct reducător faţă de zahărul total sau a proteinei pure faţă de proteina

brută, precum și intensitatea sintezei acidului ascorbic au fost mult mai mari, în toți anii, la bulbii plantați din soiul de Leascoviț (tabela 2).

Din datele privitoare la modificările biochimice și la ieșirea din repaus și gradul de vegetație al bulbilor păstrați și plantați se poate deduce că producția mai mare de semințe, care după cum se știe se obține de la bulbii plantați toamna tîrziu, este favorizată de precocitatea și de intensitatea mai mare a proceselor biochimice desfășurate în condițiile speciale de mediu în care bulbii vegetează în timpul iernii.

CONCLUZII

Din studiul de mai sus asupra modificării compoziției chimice a bulbilor de ceapă din diferite soiuri cultivate în țara noastră, păstrați în pod sau plantați toamna tîrziu, rezultă următoarele :

1. Cel mai ridicat conținut în substanță uscată și în principalele ei componente l-au avut bulbii de ceapă produși din arpagic, iar cel mai scăzut bulbii proveniți din răsad. Ceapa cultivată din semințe (ceaclama) a prezentat valori intermediare.

2. Prin păstrarea în pod timp de 4—5 luni, la temperaturi cuprinse între 1,5—7°C, conținutul bulbilor în substanță uscată totală a scăzut cu 4—11%, iar cel în zahăr total cu 5—30%. Proporția de zahăr reducător față de zahărul total, cea de proteină față de totalul substanțelor cu azot și conținutul în acid ascorbic au crescut în timpul păstrării. Activitățile invertazei, catalazei și peroxidazei au crescut mai ales la sfîrșitul perioadei de păstrare.

3. Datorită numeroaselor perioade cu temperaturi ridicate și umidității din sol, în bulbii plantați toamna tîrziu modificările compoziției chimice și activitatea enzimelor cercetate au fost mult mai intense decît la bulbii păstrați în pod.

4. În timpul păstrării, bulbii din răsad ai soiului de Buzău au suferit modificări biochimice mai profunde, datorită probabil conținutului lor mai ridicat în apă și proporției mai mari de zahăr reducător. De asemenea, în bulbii din soiul de Leascoviț, obținuți în 2 ani și plantați toamna tîrziu, au avut loc modificări biochimice mai mari decît în bulbii din soiul de Tg. Frumos, de un an.

5. Gradul de vegetație și modificarea greutății la bulbii din diferite soiuri, păstrați în pod sau plantați, au fost în strînsă legătură cu intensitatea modificărilor biochimice.

6. Modificările biochimice produse în cursul păstrării bulbilor de ceapă au fost mai asemănătoare la soiuri diferite, în același an, decît la același soi în ani diferiți. Acest fapt arată influența hotărîtoare a condițiilor anului de cultură și mediului de păstrare.

Institutul de cercetări horti-viticole, București

Prezentată la redacție la 28 octombrie 1961

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛУКОВИЦ ЛУКА В ЗИМНЕЕ ВРЕМЯ

РЕЗЮМЕ

В 1956—1959 гг. на экспериментальном пункте Цыгэнешть, Бухарестской области, авторы исследовали биохимические изменения, связанные с явлением вегетации и изменением веса для луковиц лука различных сортов, а именно для лука-сеянца, для лука водяной или прямой рассадки. Луковицы выдерживали на чердаке при 1,5—7° или сажали поздней осенью. При хранении в 125—140 дней содержание сухого вещества в луковицах понизилось на 4—11%, а общее содержание сахара на 5—30%. Пропорция восстанавливающего сахара, по сравнению с общим количеством, а также пропорция чистого белка, по сравнению с общим, увеличилась при хранении. Содержание аскорбиновой кислоты в луковице также увеличилось в 2—5 раз. Активность инвертазы, каталазы и пероксидазы повышается по мере того, как луковицы выходят из периода „спячки".

В случае посаженных луковиц, более интенсивные биохимические изменения вызвали более скорую вегетацию луковиц.

Биохимические изменения были более интенсивными, вегетация проходила скорее, а потери (от 5 до 15% в случае исследованных сортов) больше у луковиц, полученных из рассады, и меньше у луковиц, полученных из семян. Скорость окончания „спячки" и вегетация луковиц способствует наличию большей пропорции восстанавливающегося сахара, по сравнению с общим его содержанием, а также большее содержание воды в луковицах.

Биохимические изменения при хранении, имеющие большую разницу для тех же сортов, но в разные годы, чем для различных сортов в тот же год, выявляют решающее влияние условий года культивирования и факторов среды хранения.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Изменение температуры и сравнительной влажности по декадам на месте хранения.

Рис. 2. — Динамика некоторых химических компонентов луковиц, хранящихся и посаженных (отнесенная к сухому веществу).

Рис. 3. — Динамика активности некоторых энзимов луковиц, хранящихся и посаженных (отнесенная к свежему веществу).

Рис. 4. — Динамика активности инвертазы у хранящихся и посаженных луковиц.

Рис. 5. — Ритм потери веса луковиц.

Рис. 6. — Прибавление веса, процент прорастания и число корней для луковиц, посаженных в 1958—1959 гг.

LES MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES DES BULBES D'OIGNON PENDANT L'HIVER

RÉSUMÉ

Pendant la période 1956—1959, les auteurs ont étudié les modifications biochimiques en corrélation avec le début de la période de végétation et les modifications de poids dans les bulbes des différentes variétés d'oignon, cultivées à la Station expérimentale de Ţigăneşti (région de Bucarest). Les différentes variétés d'oignon étudiées ont été : les oignons de couleur, obtenus à partir des petits oignons, les oignons blancs (par repiquage) ou les oignons obtenus par semis direct. Les bulbes ont été conservés au grenier à des températures variant entre 1,5—7°, ou bien ils ont été plantés tard en automne. Pendant les 125 à 140 jours de conservation, la teneur en substance sèche des bulbes a baissé de 4 à 11% et celle en sucre total, de 5 à 30%. Le pourcentage du sucre réducteur, par rapport au sucre total, et celui de la protéine pure, par rapport à la protéine brute, ont augmenté pendant la conservation. La teneur en acide ascorbique des bulbes a également augmenté, de 2 à 5 fois. L'activité de l'invertase, ainsi que celle de la catalase et de la peroxydase se sont intensifiées à mesure que les bulbes sortaient de la période de repos.

Dans les bulbes plantés, les modifications biochimiques plus intenses ont déterminé la végétation plus rapide des bulbes.

Les modifications biochimiques ont été plus intenses, la végétation plus rapide et les pertes (comprises entre 5 et 15% pour les variétés étudiées) plus importantes, chez les bulbes obtenus par repiquage et plus réduites chez les bulbes obtenus par semis.

L'écourtement de la période de repos et la rapidité de la végétation ont été favorisés par l'existence d'une proportion plus élevée de sucre réducteur, par rapport au sucre total, et par une teneur en eau plus élevée des bulbes.

Les modifications biochimiques pendant la conservation — qui diffèrent davantage pour une même variété, d'une année à l'autre, que pour des variétés différentes, au cours de la même année, — ont montré l'influence décisive des conditions de l'année de culture et des facteurs du milieu de conservation.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Variations des températures et des humidités relatives, par décades, dans l'espace de conservation.

Fig. 2. — L'évolution de certains composants chimiques, dans les bulbes d'oignon conservés et plantés (rapportés à la substance sèche).

Fig. 3. — La marche de l'activité de certains enzymes, dans les bulbes d'oignon conservés et plantés (rapportés à la substance fraîche).

Fig. 4. — La marche de l'activité de l'invertase dans les bulbes conservés et plantés.

Fig. 5. — Le rythme de la baisse pondérale des bulbes d'oignon.

Fig. 6. — L'augmentation du poids, du pourcentage de germination et du nombre des racines des bulbes plantés en 1958—1959.

BIBLIOGRAFIE

1. FOSKETT K. L., PETERSON E. C., *Relation of dry matter content to storage quality in some onion varieties and hybrids.* Chem. abstr., *9584g* (1950).
2. HANAOKA T., ITO K., *Untersuchungen über Lagerqualität von Zwiebeln.* Landw. Zentr., **II**, *6*, 1246 (1958).
3. MAYFIELD H., RICHARDSON J., *Effect of winter storage on the vitamin content of cabbage and onion.* Chem. Abstr., *4175*[2] (1940).
4. METLITCHI V. L., *Păstrarea şi prelucrarea legumelor.* Ed. de Stat pentru literatura ştiinţifică, Bucureşti, 1952.
5. MIYAZAKI J., *Change of sugar amount in onion and Welsh onion.* Chem. Abstr., *3398f* (1959).
6. OGATA K., INONE T., *Studien über Lagerung von Zwiebel.* Landw. Zentr., **II** *2*, 351 (1959).
7. PRUSS V. şi colaboratori, *Evaluation of Czechoslovak onion varieties on the basis of chemical analyses.* Hortic. Abstr., *1*, 97 (1960).
8. RIOS E. C., *Chemical composition of some onion varieties.* Chem. Abstr., *3194e* (1958).
9. REIMERS F., *Changes of sugar and enzymatic activity in onion plants grown under different conditions.* Chem. Abstr., *8201a* (1952).
10. РЕЙМЕРС Ф., *Физиология роста и развития репчатого лука.* Изд. Акад. Наук СССР, Москва, 1959.
11. RUBIN A. B., *Bazele biochimice ale păstrării legumelor.* Traducere din limba rusă, I.S.R.S., 1956.
12. RUBIN A. B., *Ratio of synthetic to hydrolytic action of invertase as characteristic value for different varieties of onions.* Chem. Abstr., *7466*[9] (1937).
13. RUBIN A. B., TRUPP V., *Variations in keeping qualities of different varieties of vegetables and the reasons therefore.* Chem. Abstr., *1137*[9] (1936).
14. SCUPIN L., *Effect of storage and especially cold storage on the carbohydrates in onions.* Chem. Abstr., *6543b* (1950).
15. SFIRINA H., *The chemical composition of bulb onions in Moldavia.* Hortic. Abstr., *2*, 281 (1959).
16. SHERRATT I. G., *Composition of some varieties of onions.* Chem. Abstr., *5998*[4] (1944).
17. STOLEAROV S. S., *Păstrarea cepei pentru seminţe în grămezi — silozuri.* Rev. referate agric., *2*, 29 (1959).
18. TRUPP V. E., *Change in composition of vegetables during storage.* Chem. Abstr., *5194*[7] (1935).
19. WOODMAN R., BARNELL H., *The connection between the keeping qualities of commercial varieties of onions and the rates of water loss during storage.* Chem. Abstr., *8735*[3] (1937).
20. ZELLER A., *Zuckergehalt und Haltbarkeit der Küchenzwiebel.* Gartenbauwissensch., 598 (1941).
21. YAMAGUCHI M. şi colaboratori, *Die Wirkung der Lagertemperaturen auf Lagerqualität und Zusammensetzung der Zwiebel, sowie auf die nachfolgende Verfärbung der getrockneten Zwiebelflocken.* Landw. Zentr., *3*, 583 (1958).

CRIOPROTEINELE VEGETALE

NOTĂ PRELIMINARĂ

DE

VICTOR GHEŢIE şi LUCIA BUZILĂ

Termenul de crioproteine (crioglobuline) a fost introdus de A. B. Lerner şi C. J. Watson [1] pentru a defini un grup de serumglobuline umane care precipită sau se gelifică prin scăderea temperaturii sub +37°C. Temperatura critică de precipitare diferă de la caz la caz. S-au putut distinge astfel crioglobuline care precipită la temperaturi scăzute (+4°C) şi crioglobuline care precipită chiar la o temperatură apropiată de cea a corpului uman (+35°C).

Crioglobulinele au proprietăţi fizice care le situează mai ales în rîndul γ-globulinelor. S-au semnalat cazuri cînd crioglobulinele erau localizate şi în alte fracţiuni ale complexului proteic al serului ca α_2 - şi β_{2A} - globulinele [2]. Deoarece pe cale imunochimică s-au evidenţiat deosebiri între crioglobuline şi fracţiunile normale ale serului, în prezent se consideră că crioglobulinele sînt proteine nenaturale, sintetizate de celule anormale [3].

În crioglobulinemie, unul dintre cele mai importante simptome clinice este cauzat de proprietatea fizică anormală (precipitarea la rece) a acestor proteine. Astfel, prin expunerea la frig a extremităţilor se produce o sensibilizare la temperatură, o viscozitate sangvină mărită, purpură şi tromboze. Depunerea intravasculară a crioglobulinelor produce de multe ori o gravă dereglare a sistemului circulator, care în cele din urmă poate provoca moartea.

Crioprecipitarea este un fenomen care se întîlneşte însă destul de rar în sîngele uman. În afara cazurilor patologice, literatura nu mai semnalează această proprietate decît la o fracţiune a fibrinogenului şi la proteina C-reactivă [2]. De aceea putem considera că în regnul animal prezenţa crioproteinelor este incidentală, fiind legată de o dereglare a metabolismului proteic.

Prezenţa crioproteinelor în regnul vegetal nu am găsit-o semnalată decît într-o lucrare a lui D. Briggs şi L. Mann [4]. Autorii au constatat că prin răcirea extractelor apoase obţinute din soia, precipită

o fracțiune proteică pe care au denumit-o fracțiune insolubilă la rece („cold insoluble fraction").

În timpul cercetării proteinelor din semințele de fasole și bob am observat de asemenea că răcirea extractelor apoase sub temperatură de +20°C determină precipitarea unei fracțiuni proteice și că această fracțiune se redizolvă după aducerea extractelor la temperatura camerei.

Prezența în semințele de soia, fasole și bob a unor fracțiuni proteice insolubile la rece ne-a determinat să cercetăm fenomenul de crioprecipitare și în extractele apoase obținute din semințele altor plante. S-a lucrat cu numeroase specii din familii și ordine diferite, atît gimnosperme, cît și angiosperme. În majoritatea cazurilor, am reușit să punem în evidență fenomenul de crioprecipitare a unor proteine. Prin analogie cu termenul folosit în biochimia medicală, aceste proteine le-am denumit crioproteine.

S-a procedat astfel: s-au măcinat semințele într-o moară de laborator. Făina obținută s-a cernut printr-o sită cu ochiurile de 0,4 mm. Extracția s-a făcut cu apă bidistilată, folosind un raport de 1 parte făină /5 părți apă. Operația s-a efectuat timp de 30 min în agitatorul mecanic, după care extractul s-a centrifugat timp de 30 min la 5 000 g. Pentru îndepărtarea peliculei de grăsimi de la suprafața lichidului, supernatantul a fost filtrat și apoi pus la frigider, la o temperatură cuprinsă în tot timpul experiențelor între +4 și +8°C. S-au făcut observații asupra crioprecipitării la o oră, 24 ore, 48 ore, uneori și la o săptămînă după punerea extractului la rece. Pentru a verifica dacă precipitarea nu este cauzată de denaturarea proteinelor sau prin acțiunea proteazelor, s-a urmărit paralel comportarea extractelor ținute la +20°C. De asemenea, s-a verificat reversibilitatea crioprecipitării prin redizolvarea precipitatelor la temperatura camerei și repetarea precipitării la rece. Această operație a fost făcută de cîteva ori, fără a se constata dispariția fenomenului. Natura proteică a precipitatului am evidențiat-o prin efectuarea reacțiilor specifice de recunoaștere.

Răspîndirea crioproteinelor în semințele plantelor este dată în tabela 1.

Se observă că crioproteinele sînt prezente atît în filumul gimnospermelor, cît și în filumul angiospermelor. La angiosperme se pot evidenția crioproteine atît în clasa dicotiledonatelor, cît și în clasa monocotiledonatelor. În cadrul familiilor studiate, se constată că răspîndirea crioproteinelor prezintă trei aspecte: familii în care toți reprezentanții cercetați posedă crioproteine (*Leguminosae*, *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Cruciferae* etc.), familii unde nu s-au putut identifica crioproteine la speciile cercetate (*Gramineae*, *Umbelliferae*, *Chenopodiaceae* etc.) și familii în care la unii reprezintanți s-au putut identifica crioproteine, iar la alții nu (*Compositae*, *Abietaceae*).

Rezultatele negative nu pot fi considerate ca un semn sigur că în semințele respective nu există crioproteine, deoarece intensitatea crioprecipitării este dependentă de concentrația proteică a soluției examinate, așa cum a arătat R. Volpé și colaboratori [6] pentru serul sangvin uman patologic: în urma diluării serului cu o soluție salină izotonică, cantitatea de crioprecipitat scade considerabil, iar pentru o diluție 1 : 4 crioprecipitarea nu mai are loc. Această dependență a crioprecipitării de concentrația proteică a soluției examinate am verificat-o și noi pe un extract apos de bob, care s-a diluat cu cantități crescînde de tampon fosfat de pH 6,0.

Concentrația proteică a probelor examinate a fost determinată cu micrometoda Dzialoszynski [7]. Prin determinarea concentrației proteice a

Tabela 1

Răspîndirea crioproteinelor în semințele plantelor superioare *)

Ordinul	Familia	Specia	Crioprecipitarea extractelor apoase de sămînță **)
		GIMNOSPERME	
Ginkgoales	*Ginkgoaceae*	*Ginkgo biloba*	++
Coniferales	*Abietaceae*	Bradul (*Abies alba*)	+
		Molidul (*Picea excelsa*)	−
		Pinul negru (*Pinus nigra*)	++
	Taxaceae	Tisa (*Taxus baccata*)	++
	Cupressaceae	Ienupărul (*Juniperus communis*)	−
Gnetales	*Gnetaceae*	Cîrcelul (*Ephedra distachya*)	−
		ANGIOSPERME	
Magnoliales	*Mangnoliaceae*	Magnolia (*Magnolia yulan*)	+
Rosales	*Rosaceae*	Mărul (*Malus silvestris*)	++
		Părul (*Pirus communis*)	++
		Prunul (*Prunus domestica*)	++
		Caisul (*Prunus armeniaca*)	++
Leguminosales	*Leguminosae*	Glădița (*Gleditschia triacanthos*)	+
		Fasolea (*Phaseolus vulgaris*)	+++
		Soia (*Soja hispida*)	+++
		Lucerna (*Medicago sativa*)	+
		Trifoiul (*Trifolium pratense*)	+
		Măzărichea (*Vicia sativa*)	++
		Bobul (*Vicia faba*)	+++
		Lintea (*Lens esculenta*)	++
		Mazărea (*Pisum sativum*)	+++
		Salcîmul (*Robinia pseudacacia*)	++
		Glicina (*Wistaria sinensis*)	++
		Alunele de pămînt (*Arachis hypogeea*)	+
Umbelliflorales	*Umbelliferae*	Pătrunjelul de grădină (*Petroselinum hortense*)	−
		Chimenul (*Carum carvi*)	−
		Mărarul (*Anethum graveolens*)	−
Malvales	*Tiliaceae*	Teiul pădureț (*Tilia cordata*)	++
	Malvaceae	Bumbacul (*Gossypium herbaceum*)	−
		Bamele (*Hibiscus esculentus*)	−
Geraniales	*Linaceae*	Inul (*Linum usitatissimum*)	+++
	Balsaminaceae	*Impatiens balsamina*	+
Tricoccae	*Euphorbiaceae*	Ricinul (*Ricinus communis*)	+++
Anacardiales	*Aceraceae*	Arțarul (*Acer platanoides*)	++
		Paltinul (*Acer pseudoplatanus*)	+++
Tubiflorales	*Solanaceae*	Tomatele (*Solanum lycopersicum*)	+
		Ardeiul (*Capsicum annuum*)	++
	Convolvulaceae	Zorelele (*Pharbitis hispida*)	−
Scrophulariales	*Scrophulariaceae*	Gura leului (*Anthirrhinum majus*)	−
	Labiatae	Salvia (*Salvia splendens*)	+
	Pedaliaceae	Susanul (*Sesamum indicum*)	+

Tabela 1 (continuare)

Ordinul	Familia	Specia	Crioprecipitarea extractelor apoase de sămînță **)
Cruciferales	*Papaveraceae*	Macul (*Papaver somniferum*)	++
	Cruciferae	Varza (*Brassica oleracea*)	+++
		Muștarul alb (*Sinapis alba*)	++
		Ridichea (*Raphanus sativus*)	+++
Campanulales	*Cucurbitaceae*	Dovleacul (*Cucurbita maxima*)	+++
		Castravetele (*Cucumis sativus*)	++
		Pepenele galben (*Cucumis melo*)	+++
		Pepenele verde (*Citrulus vulgaris*)	++
Compositales	*Compositae*	Salata (*Lactuca sativa*)	—
		Floarea-soarelui (*Helianthus anuus*)	+
		Șofrănel (*Carthamus tinctorius*)	++
Fagales	*Fagaceae*	Stejarul (*Quercus robur*)	—
Urticales	*Cannabinaceae*	Cînepa (*Cannabis sativa*)	++
Polygonales	*Polygonaceae*	Hrișca (*Fagopyrum esculentum*)	++
Centrosperme	*Chenopodiaceae*	Sfecla (*Beta vulgaris*)	—
		Spanacul (*Spinacia oleracea*)	—
Liliiflorales	*Liliaceae*	Ceapa (*Allium cepa*)	+
		Prazul (*Allium porrum*)	+
Graminales	*Gramineae*	Porumbul (*Zea mays*)	—
		Orezul (*Oryza sativa*)	—
		Ovăzul (*Avena sativa*)	—
		Grîul (*Triticum sativum*)	—

*) Tabloul ordinelor la gimnosperme și angiosperme a fost dat după I. Moraru [5].
**) Intensitatea crioprecipitării s-a notat astfel: — absentă; + slabă; ++ medie; +++ puternică.

soluției înainte și după îndepărtarea proteinei precipitate la rece se poate calcula cantitatea de crioproteină din proba respectivă (% din proteina totală extrasă). Rezultatele care arată variația cantității de crioproteină precipitată în funcție de concentrația proteică a probelor examinate sînt înfățișate în figura 1.

Din figură se observă că pentru concentrații sub 5 mg/ml nu se mai produce crioprecipitarea. Din acest motiv, se poate ca în extractele la care nu s-a evidențiat precipitarea la rece, crioproteinele să fie într-o concentrație prea mică.

Crioprecipitarea este dependentă nu numai de concentrația proteică, ci și de pH-ul și puterea ionică a extractelor. Astfel, prin experiențe efectuate asupra semințelor de fasole, bob, soia, castraveți și varză, am constatat că precipitarea la rece are loc de la pH-uri acide, care pornesc din vecinătatea pH-ului izoelectric al proteinelor respective, pînă la pH-uri care nu depășesc 7,5. În general, peste pH-ul 8,0 nu s-a mai putut evidenția crioprecipitarea la nici un extract studiat. Există pentru fiecare plantă un pH optim la care precipită cantitatea maximă de crioproteine. Pentru crioproteina din bob, pH-ul optim este în jurul valorii 6,0.

Influența puterii ionice a fost cercetată de asemenea pe semințele de bob. S-a constatat că la pH = 6,0 crioprecipitarea este împiedicată dacă se folosesc extracte cu tampon fosfat avînd o concentrație mai mare de 0,15 M. Se poate spune că există nu numai un pH optim, ci și o putere ionică optimă, la care precipită cantitatea maximă de proteină insolubilă la rece.

În sfîrșit, fenomenul de crioprecipitare depinde de temperatură. Temperatura la care începe precipitarea diferitelor fracțiuni proteice este dependentă de concentrația în crioproteine a extractului. Am observat că temperatura de crioprecipitare este cu atît mai joasă cu cît concentrația proteică a extractului este mai mică, fapt care stă în deplină concordanță cu datele lui R. Volpé și colaboratori asupra crioglobulinelor serice [6]. În general, în toate extractele cercetate, crioprecipitarea a început la o temperatură cuprinsă între +8 și +15°C.

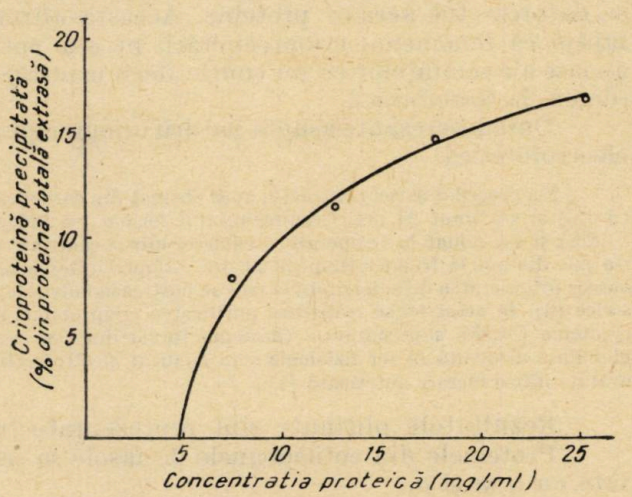


Fig. 1. — Precipitarea crioproteinelor din semințele de bob, în funcție de concentrația proteică totală a extractelor ($T = +8$°C).

Ținînd seama de toți acești parametri de care depinde crioprecipitarea (concentrația proteică, pH-ul, puterea ionică și temperatura), am încercat să evidențiem acest fenomen și în extractele obținute din alte organe ale plantelor. S-a urmărit astfel comportarea la rece a extractelor obținute din frunze sau plantule întregi, aparținînd celor mai diferite specii (fasole, trifoi, ardei, mac, varză, castraveți și floarea-soarelui) însă nu am putut evidenția fenomenul de crioprecipitare. La extractele obținute din frunze trebuie avută în vedere tendința acestora de a precipita la o păstrare mai prelungită, atît la rece cît și la temperatura camerei. În aceste cazuri, așa cum a arătat R. Heitefuss și colaboratori [8], se petrece un fenomen de agregare și de denaturare a proteinelor din soluție, care devin insolubile și precipită. Aceste precipitate nu se mai redizolvă însă dacă aducem extractele la temperatura camerei sau la +37°C, dovadă sigură că în acest caz nu este vorba de crioproteine.

Aceste experiențe ne-au condus la concluzia că crioproteinele par a fi răspîndite numai în semințele plantelor.

Complexul proteic al semințelor în care s-au identificat crioproteine în cantitate mare (*Leguminosae*, *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Euphorbiaceae* etc.) este constituit mai ales din proteine de tipul globulinelor [9]. Prin determinarea solubilității în apă distilată s-a constatat că în semințele

de prun, fasole, bob, dovleac, castraveți și ricin crioprecipitatul este o globulină. De aceea, putem considera că în aceste cazuri semințele conțin crioglobuline. Este posibil ca și la celelalte semințe unde globulinele sînt componentul proteic majoritar, apariția fenomenului de crioprecipitare să se datoreze tot acestor proteine. Această afirmație este susținută și de faptul că fenomenul crioprecipitării nu s-a putut evidenția în extractele apoase ale semințelor ce nu conțin decît cantități neînsemnate de globuline (de ex. la *Gramineae*).

Date interesante asupra naturii crioprecipitatului a furnizat și analiza electroforetică.

S-a procedat astfel : extractul apos obținut din cotiledoanele de fasole s-a pus la frigider (+6°C) și s-a ținut 24 ore. Crioprecipitatul format s-a îndepărtat prin centrifugare la rece (+8°C) și s-a reluat la temperatura camerei într-o cantitate minimă de ser fiziologic. Soluția s-a pus din nou la frigider timp de 24 ore. Crioprecipitarea se poate repeta de cîteva ori, deoarece proprietatea de a precipita la rece se păstrează indefinit, ca și în cazul unor crioglobuline serice [2]. În acest fel se realizează purificarea crioproteinei respective. Extractul apos inițial (proteina totală), supernatantul (proteina totală din care s-a eliminat crioglobulina) și crioglobulina dizolvată în ser fiziologic s-au analizat electroforetic. Condițiile de analiză sînt cele arătate într-o lucrare anterioară [10].

Rezultatele obținute sînt reprezentate în figura 2.

Proteinele din cotiledoanele de fasole se separă în trei fracțiuni, notate cu *l*, *m* și *n*.

Se constată că crioglobulina este alcătuită dintr-o fracțiune a proteinei de rezervă notată *l*. După cum am arătat într-o lucrare anterioară [10], componentul *l* nu posedă o structură unitară, fiind format din două subfracțiuni cu caractere antigenice diferite. Una din aceste două subfracțiuni este o cenapsă lipoproteică, iar cealaltă se găsește necombinată sau intră în asociație cu glucidele. Din examinarea curbelor electroforetice se observă că crioproteina precipitată este o globulină, fiind constituită mai ales din subfracțiunea lipoproteică.

Existența crioproteinelor în semințele plantelor arată că, spre deosebire de regnul animal, proprietatea fizică a moleculei proteice de a-și modifica considerabil solubilitatea în funcție de temperatură nu este o proprietate care apare numai în cazuri excepționale (patologice), ci poate fi o însușire obișnuită a moleculei proteice. Mai mult decît atît, crioproteinele din semințele plantelor ar putea avea chiar un rol fiziologic important, determinînd temperatura minimă la care semințele pot germina.

Teoretic crioproteinele ar putea interveni în procesul germinativ pe două căi :

a) Pornind de la faptul cunoscut, pe care l-am observat și la crioproteinele vegetale, că viscozitatea unei soluții ce conține crioproteină animală crește foarte mult la răcire [6], se poate presupune că, în cazul semințelor îmbibate, prin scăderea temperaturii mediului ambiant crește foarte mult viscozitatea conținutului celular, fără ca să se petreacă însă fenomenul de crioprecipitare. Viscozitatea crescută a mediului de reacție încetinește procesele enzimatice care declanșează și însoțesc germinația. Deoarece la acest efect se adaugă și scăderea activității enzimelor la tem-

peraturi scăzute, se poate ajunge chiar la blocarea proceselor enzimatice care determină dezvoltarea embrionului.

b) Pentru o anumită temperatură a mediului ambiant putem presupune că semințele îmbibate nu mai germinează, deoarece crioproteinele precipită intracelular. În felul acesta ele se sustrag acțiunii enzimelor proteolitice și nu mai pot fi desfăcute în aminoacizi, care sînt necesari pentru nutriția embrionului. Deoarece aminoacizii pot fi furnizați embrionului și prin desfacerea proteinelor care nu precipită la rece, trebuie să lărgim presupunerea noastră admițînd că crioproteinele conțin anumiți aminoacizi în plus față de celelalte proteine și că aceștia sînt indispensabili pentru dezvoltarea embrionului în momentul ontogenetic respectiv.

Cele două mecanisme ipotetice de intervenție a crioproteinelor în procesul germinativ, schițate mai sus, pot opera și împreună într-o succesiune determinată.

Ar fi greșit însă să considerăm că crioproteinele ar putea avea acest rol însemnat în toate semințele la care au fost semnalate. Ca și la ser, unde cercetările au arătat că numai pentru o concentrație destul de mare crioglobulinele influențează procesele metabolice [6], tot așa și la semințe trebuie să existe, probabil o concentrație suficient de mare de crioproteine pentru ca ele să poată interveni în procesul germinativ. De asemenea, trebuie să fie îndeplinite și celelalte condiții indispensabile crioprecipitării, cum ar fi, de exemplu, valoarea pH-ului celular și concentrația electroliților în celulă. Numai în cazul semințelor la care există toate aceste condiții, prezența crioproteinelor ar influența temperatura de germinație.

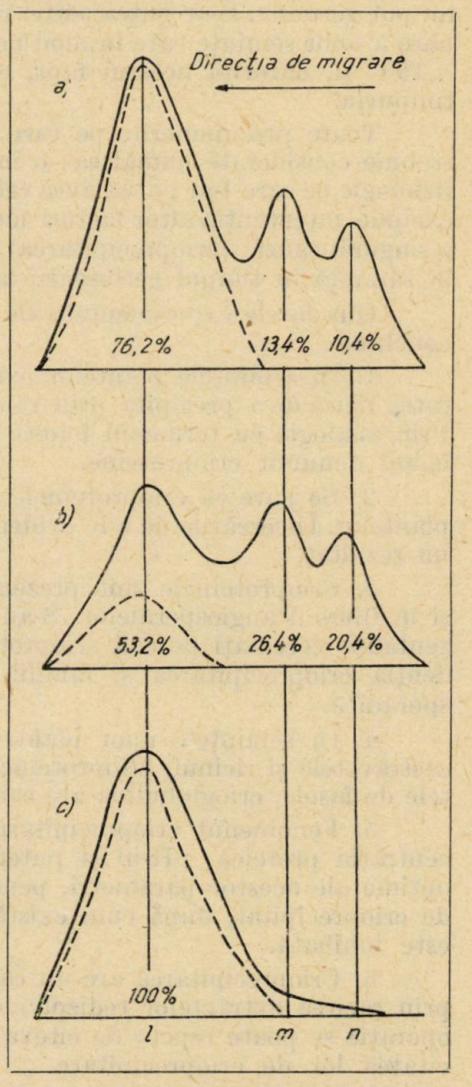


Fig. 2. — Curbele electroforetice ale proteinelor din fasole.
a) Proteina totală; *b*) proteina totală din care s-a eliminat crioglobulina; *c*) crioglobulina; linia continuă: proteinograma; linia întreruptă: lipidograma.

Din cele înfățișate se desprinde o concluzie care poate avea consecințe practice importante. Inhibarea *in vivo* a crioprecipitării ar trebui

să determine extinderea intervalului de temperatură în care germinează semințele, spre temperaturi mai scăzute, unde în mod normal semințele nu pot germina. S-ar putea astfel realiza coborîrea temperaturii de germinare a unor semințe care în mod normal nu pot încolți la temperaturi sub +10°C și, datorită acestui fapt, ele ar putea fi semănate în cîmp mai timpuriu.

Toate presupunerile pe care le-am emis în ultima parte a lucrării trebuie considerate numai ca o încercare de a explica rolul biochimic și fiziologic pe care l-ar putea avea crioproteinele prezente în semințe (fără a exclude intervenția altor factori metabolici), și nicidecum ca o reducere la o singură cauză (crioprecipitarea) a fenomenelor complexe ce se petrec în sămînță în timpul germinării la temperaturi joase.

Din datele experimentale ale acestei lucrări se desprind următoarele concluzii :

1. În semințele plantelor există fracțiuni proteice care au proprietatea fizică de a precipita prin răcirea extractelor în care sînt dizolvate. Prin analogie cu termenul folosit în biochimia medicală, aceste proteine le-am denumit crioproteine.

2. Se pare că crioproteinele se găsesc răspîndite numai în semințele plantelor. Încercările de a le evidenția în celelalte organe nu au dus la nici un rezultat.

3. Crioproteinele sînt prezente atît în filumul gimnospermelor, cît și în filumul angiospermelor. S-au putut deosebi familii unde toți reprezentanții cercetați posedă crioproteine, familii în care nu s-a putut evidenția crioprecipitarea și familii unde răspîndirea crioproteinelor este sporadică.

4. În semințele unor plante ca prunul, fasolea, bobul, dovleacul, castravetele și ricinul, crioproteinele sînt de tipul globulinelor. La semințele de fasole, crioglobulina are caracterul unei cenapse lipoproteice.

5. Fenomenul crioprecipitării depinde de temperatură și de concentrația proteică, pH-ul și puterea ionică a extractelor. Există valori optime ale acestor parametri, pentru care se obține o cantitate maximă de crioprecipitat, după cum există și valori pentru care crioprecipitarea este inhibată.

6. Crioprecipitarea are un caracter reversibil, precipitatele obținute prin răcirea extractelor redizolvîndu-se la temperatura camerei. Această operație se poate repeta de cîteva ori, fără ca extractele să piardă capacitatea lor de crioprecipitare.

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
București

Prezentată la redacție la 9 octombrie 1961

РАСТИТЕЛЬНЫЕ КРИОПРОТЕИНЫ

ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ СООБЩЕНИЕ

РЕЗЮМЕ

В работе показано, что охлаждение водных экстрактов некоторых семян вызывает осаждение некоторой белковой фракции. Явление криоосаждения обратимо, так как осадок вновь растворяется при доведении температуры экстракта до комнатной. Указанную операцию можно многократно повторять; способность криоосаждаться сохраняется постоянно. По аналогии с применяемым в медицинской биохимии термином указанная фракция была названа криопротеиновой. По-видимому, криопротеины распространены только в семенах растений; они находятся как в гимноспермах, так и в ангиоспермах. Были выявлены семейства, все исследованные представители которых содержат криопротеины (Leguminosae, Cucurbitaceae Rosaceae и Cruciferae), семейства, для которых не было выявлено криоосаждения (Gramineae, Umbelliferae, Chenopodiaceae), а также и семейства, у которых распространение криопротеинов является спорадическим (Compositae, Abietaceae). В семенах некоторых растений, как например слива, фасоль, бобы, тыква, огурец и рециновое дерево, — криопротеины являются глобулинового типа. У семян фасоли криоглобулин обладает характером липопротеинового ченапса.

Явление криоосаждения зависит от температуры и белковой концентрации, от pH и ионной силы экстрактов. Было замечено, что критическая температура криоосаждения, тем ниже, чем меньше белковая концентрация экстракта. Для белковых концентраций, находящихся ниже некоторого значения, криоосаждение может вообще не происходить. Осаждение при охлаждении происходит в интервале pH, заключенном, приблизительно, между изоэлектрическим pH соответствующих белков и pH = 7,5. Криоосаждение измеряется обратно пропорционально ионной силе раствора. Для больших значений ионной силы криоосаждение белков замедляется.

Криопротеины семян играют возможно определенную роль в процессе прорастания. Авторы предложили два гипотетических механизма, по которым могли бы действовать эти протеины:

1. При понижении температуры окружающей среды в клетках обработанных семян, благодаря криопротеинам, может настолько повышаться вязкость содержимого клетки, что энзиматические процессы, вызывающие и сопровождающие прорастание, значительно замедляются. Ввиду того, что к этому добавляется еще и снижение активности энзимов при низких температурах, возможно даже вызвать блокировку энзиматических процессов.

2. Криопротеины могут даже осаждаться внутри клеток, при понижении температуры окружающей среды. В этом случае, они не находятся более под влиянием протеолитических энзим и, по-видимому, не могут больше выделять некоторые аминокислоты, необходимые для развития зародыша.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Осаждение криопротеинов семян бобов, в зависимости от общей белковой концентрации экстрактов (T = + 8°C).

Рис. 2. — Электрофоретические кривые белков фасоли; *a*) общее содержание белков; *b*) общее содержание белков, из которых был выделен криоглобулин; *c*) криоглобулин. Непрерывная линия — протеинограмма. Прерывистая линия; липидограмма.

LES CRYOPROTÉINES VÉGÉTALES

NOTE PRÉLIMINAIRE

RÉSUMÉ

Les auteurs ont démontré que le refroidissement des extraits aqueux de certaines semences détermine la précipitation d'une fraction protéique. Le phénomène de cryoprécipitation est réversible, le précipité étant redissout en portant la température de l'extrait à la température de la chambre. Cette opération peut être répétée plusieurs fois, car la propriété de cryoprécipitation se conserve indéfiniment. Par analogie avec le terme utilisé en biochimie médicale, on a dénommé cette fraction cryoprotéine. Il semble que les cryoprotéines ne sont répandues que dans les semences des plantes, étant présentes tant chez les gymnospermes que chez les angiospermes. On a pu individualiser des familles chez lesquelles tous les représentants observés possèdent des cryoprotéines (Légumineuses, Cucurbitacées, Rosacées, Crucifères), ainsi que des familles chez lesquelles on n'a pas pu mettre en évidence la cryoprécipitation (Graminées, Ombellifères, Chénopodiacées) et des familles où les cryoprotéines apparaissent de façon sporadique (Composées, Abiétacées). Dans les semences de certaines plantes telles que : le prunier, le haricot, le pois, le potiron, le concombre et le ricin, les cryoprotéines sont du type des globulines. Dans les semences de haricot, la cryoglobuline a le caractère d'une cénapse lipo-protéique.

Le phénomène de cryoprécipitation dépend de la température et de la concentration protéique, du pH et du pouvoir ionique des extraits. On a remarqué ainsi que la température critique de cryoprécipitation est d'autant plus basse que la concentration protéique de l'extrait est moindre. Pour les concentrations protéiques qui baissent au-dessous d'une certaine limite, la cryoprécipitation peut même être absente. La précipitation à froid a lieu dans un intervalle du pH situé approximativement entre le pH iso-électrique de la protéine respective et le pH de 7,5. La cryoprécipi-

tation varie d'une façon inversement proportionnelle avec le pouvoir ionique de la solution. Pour des pouvoires ioniques élevés, la précipitation des protéines à froid est inhibée.

Les cryoprotéines des semences pourraient avoir un rôle bien déterminé dans le processus germinatif. On a esquissé deux mécanismes hypothétiques pour l'action de ces protéines.

1. La baisse de la température du milieu ambiant, dans les cellules des semences imbibées, peut grâce aux cryoprotéines faire augmenter à tel point la viscosité du contenu cellulaire que les processus enzymatiques qui déclenchent et accompagnent la germination en soient considérablement ralentis. Etant donné qu'à cet effet s'ajoute aussi la baisse de l'activité des enzymes, à des températures basses, on peut arriver même au blocage des processus enzymatiques.

2. Les cryoprotéines peuvent même précipiter dans le milieu intracellulaire, par baisse de la température du milieu ambiant. Dans ce cas, elles parviennent à se soustraire à l'action des enzymes protéolytiques et, probablement, ne peuvent plus fournir certains acides aminés, qui sont indispensables au développement de l'embryon.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — La précipitation des cryoglobulines des semences de fève, en fonction de la concentration protéique totale des extraits (T = + 8°C).

Fig. 2. — Courbes électrophorétiques des protéines du haricot. *a*) Protéines totales. *b*) Protéines totales dont on a éliminé la cryoglobuline. *c*) Cryoglobuline.

Trait plein = le protéinogramme. Trait discontinu = le lipidogramme.

BIBLIOGRAFIE

1. A. B. LERNER, C. J. WATSON, *Studies of cryoglobulins. I. Unusual purpura associated with the presence of a high concentration of cryoglobulin (cold precipitable serum globulin)*. Am. J. Med. Sci., **214**, *4*, 410 (1947).
2. G. BISERTE, *Les cryoglobulinémies*. Ann. biol. clin., **19**, *3—4*, 265 (1961).
3. F. W. PUTNAM, A. MIYAKE, *Proteins in multiple myeloma. VI. Cryoglobulins*. Arch. biochem. biophys., **65**, *1*, 39 (1956).
4. D. BRIGGS, L. MANN, *An electrophoretic analysis of soybean proteins*. Cereal chem., **27**, 243 (1950).
5. I. MORARU, *Botanică generală şi sistematică*. Ed. agro-silvică, Bucureşti, 1960.
6. R. VOLPÉ, A. B. ROBERTSON, A. A. FLETCHER, W. B. CHARLES, *Essential cryoglobulinaemia*. Am. J. Med., **20**, 533 (1956).
7. L. M. DZIALOSZYNSKI, *Colorimetric micro letermination of protein*. IV-th International Congress of Biochemistry, Wien, sect. 17—13, 199 (1958).
8. R. HEITEFUSS, J. BUCHANAN-DAVIDSON, M. A. STAHMANN, *The stabilisation of extract of cabbage leaf proteins by polyhydroxy compounds for electrophoretic and immunological studies*. Arch. biochem. biophys., **85**, 200 (1959).
9. E. WALDSCHMIDT-LEITZ, *Pflanzliche Eiweisskörper*, în W. RUHLAND, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, **8**, 301—302 (1958).
10. V. GHETIE, L. BUZILĂ, *Proteinele de rezervă şi proteinele protoplasmatice din sămînţa de fasole* (Phaseolus vulgaris). Studii şi cercetări de biochimie, **IV**, *2*, 241 (1961).

REACȚIA UROROZEINEI ÎN EFORTUL FIZIC

DE

G. HARALAMBIE

În ultimul deceniu, cercetările asupra fenomenelor biochimice care au loc în organismul omenesc cu ocazia efectuării de eforturi sportive de diverse tipuri au cunoscut o dezvoltare considerabilă. Lucrările în această direcție au permis să se clarifice unele aspecte teoretice destul de importante și au condus la elaborarea sau adaptarea unor metode de control biochimic, în cadrul controlului complex medico-sportiv, care contribuie la urmărirea adaptării organismului la efort, prevenirea stării de supraantrenament, stabilirea unei alimentații raționale etc.

Tendința actuală este de a se pune la îndemîna practicienilor probe de control cît mai simple, comode și rapide, ținînd seama de necesitatea de a se urmări evoluția unui întreg grup de subiecți, la intervale scurte de timp, ca de exemplu în cadrul cantonamentelor sau competițiilor sportive de durată mai lungă. Pe de altă parte, există situații în care se utilizează astfel de probe simple fără a se cunoaște suficient nici semnificația lor fiziologică și implicațiile în metabolismul general de efort, nici influența pe care o exercită asupra rezultatelor obținute alți factori, legați fie de metoda de lucru, fie de mediu.

Recent a fost comunicată o lucrare privind utilizarea reacției cu nitrit de sodiu — reacția urorozeinei a lui Nencki — ca probă de control în efort [1]. Simplitatea acestei probe, rezultatele obținute prin aplicarea ei la ciclişti, cît și legătura ei cu metabolismul proteic ne-au îndemnat să o studiem mai amănunțit în sensul celor arătate mai sus. Lucrarea de față prezintă datele preliminare obținute.

METODE DE LUCRU

În cercetările efectuate au fost urmărite două aspecte principale: cel chimic — modificarea cantitativă a metodei de lucru, studiul unor caracteristici ale reacției, observații asupra compușilor implicați; cel

fiziologic — influența diferitelor tipuri de efort și a altor factori asupra dinamicii valorilor. S-au utilizat reactivi cu grad de puritate analitică. Determinările s-au efectuat cu fotometrul Pulfrich sau fotocolorimetrul Visomat. Spectrele de absorbție în domeniul vizibil s-au obținut cu un spectrofotometru SF 4. Cromatogramele s-au efectuat pe hîrtie SS 2043 b, ascendent, monodimensional, în sistem butanol-acid acetic-apă sau izopropanol-amoniac-apă.

S-a lucrat totdeauna cu urină proaspăt recoltată și filtrată. Alte preciziuni sînt indicate în lucrare.

REZULTATE

1) Modificarea cantitativă a metodei

Achim și colaboratori [1] au folosit simpla apreciere vizuală a colorației ce se producea într-un amestec de 10 ml urină cu 5 ml HCl concentrat, prin adăugarea unei picături de soluție de nitrit de sodiu. Am verificat în primul rînd influența naturii și proporției acidului. Adăugarea de acid unei probe de urină, în raportul de mai sus, de 1 : 2 în volume, produce o colorație variind de la galben închis la brun ; prezența nitritului intensifică culoarea, cu o nuanță de la roz la brun-roșcat. Am păstrat raportul indicat, citind la fotometru în regiunea albastră a spectrului extincția soluției cu nitrit, față de o probă martor fără nitrit. În aceste condiții acizii clorhidric (d = 1,19) și sulfuric (d = 1,83) nu dau rezultatele reproductibile. Utilizînd acid acetic glacial sau acid fosforic 85—89%, se obțin valori reproductibile, cu o eroare în general mai mică de 3%. Am utilizat în continuare acidul fosforic, care mai are și avantajul de a nu fi volatil.

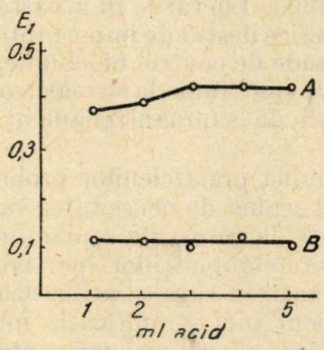


Fig. 1. — Influența proporției de acid asupra reacției urorozeinei.

A — 20 ml urină și cantități variabile de acid fosforic 85%, adus la același volum, citit față de apă, la fotocolorimetrul Visomat, cu filtre albastre ; *B* — același sistem, plus 0,15 ml soluție 0,5 % $NaNO_2$, citit față de probele corespunzătoare fără nitrit, 15 min după preparare. Extincția e practic constantă, de 0,118 ± 0,0079.

Urmărind influența proporției de acid în probe de urină aduse la același volum, se observă că pe cînd coloratia produsă de acidul singur depinde de concentrația sa finală, cea formată la adăugarea de nitrit este practic independentă de aceasta, între limitele urmărite (fig. 1). Se poate deci admite că variații mici ale concentrației de acid în probe, față de raportul 1 : 2 menționat, nu au influență asupra rezultatului.

Pentru a stabili timpul optim de citire a rezultatelor, s-a urmărit variația extincției probelor în funcție de timp ; după cum se vede din figura 4, coloratia este complet dezvoltată după 10—12 min de la preparare.

Faptul că în cazul de față este valabilă legea Lambert-Beer a fost verificat atît pe extracte în izobutanol ale coloratiei produse în probe de urină în prealabil filtrate și extrase cu cloroform, cît și direct pe diluții de urină. În ambele cazuri rezultatele au fost satisfăcătoare (fig. 2).

2) Alte observații privitoare la reacție

Păstrarea urinei, fie 4—5 ore la temperatura camerei, fie 24 ore la răcitor, nu influențează rezultatele, cu toate că în ultimul caz se formează un precipitat abundent, slab colorat, ce se îndepărtează prin filtrare. Extragerea prealabilă a urinei cu cloroform la pH 5,5—6,5 nu influențează nici

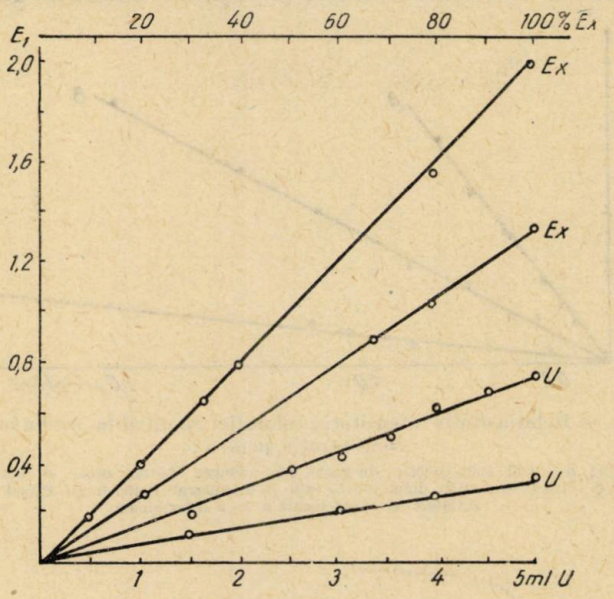


Fig. 2. — Aplicabilitatea legii Lambert-Beer la reacția urorozeinei.

Ex. — diluții de extracte izobutanolice de urini normale în care s-a efectuat reacția (100% = nediluat);
U — cantități variabile de urină; citire la fotometrul Pulfrich cu filtrul S 47.

ea valorile obținute; aceeași observație se poate aplica și tratării cu clorură de bariu. Dimpotrivă, precipitarea cu acetat de plumb sau extragerea cu izobutanol sau alcool izoamilic au ca urmare scăderea considerabilă a intensității colorației. Toate observațiile s-au făcut pe probe de urină de la subiecți sănătoși, în repaus.

După obținerea colorației, ea e extractibilă cu izo- sau n-butanol și alcool izoamilic, dar nu trece în cloroform sau toluen. Adăugarea de ovalbumină în soluție nu modifică rezultatul.

3) Substanțe implicate în reacție

Încă în 1884, Salkowski a remarcat că acidul 3-indolilacetic, rezultat din descompunerea unor substanțe proteice, se colorează în roșu cu nitritul în soluție puternic acidă. Reacția cu nitrit în mediu acid e considerată destul de specifică derivaților indolici pentru a fi utilizată la identificarea spoturilor lor pe cromatograme [9]. Plecînd de la aceste fapte și de la alte observații din literatura de specialitate [1], [14], [17], am urmărit unele aspecte ale reacției cu nitrit pe compuși indolici puri. Cercetările nu sînt complete, însă din faptele observate se pot aminti cele de mai jos.

Histidina, tirozina, arginina, cisteina şi acidul hipuric, în proporţii corespunzătoare celor din urina normală, nu dau reacţia şi nu par a o influenţa.

Triptofanul dă o coloraţie variind, în funcţie de condiţii, de la galben la roşu. Lucrînd în condiţiile arătate, se obţine o coloraţie galbenă, parţial

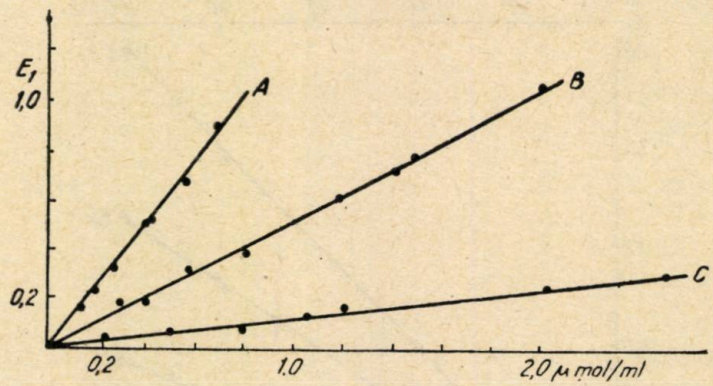


Fig. 3. — Relaţia dintre intensitatea coloraţiei cu nitrit în mediu fosforic şi concentraţie, pentru :

A — indol; *B* — acid indolilacetic (în probe s-au adăugat 20 mg uree) şi 5-hidroxitriptamină; *C* — triptofan; citire după 10—15 min la fotometrul Pulfrich cu filtrul S 47. Rezultatele prezintă media a 4—5 determinări.

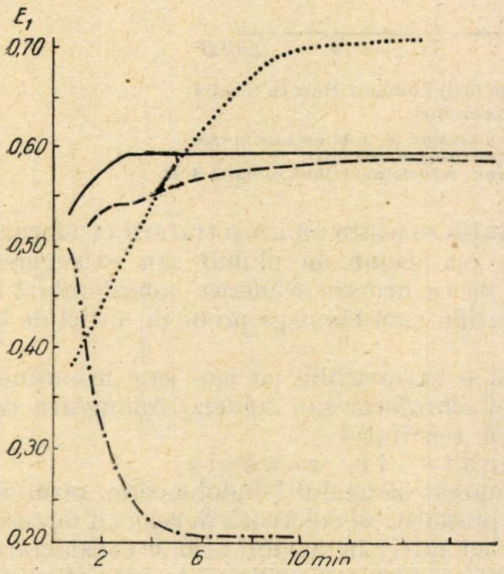


Fig. 4. — Dezvoltarea coloraţiei în funcţie de timp :

——— 2 ml soluţie 250 mg% acid 3-indolilacetic + 3 ml acid fosforic 89% + 1 ml soluţie 0,5% nitrit + 15 ml soluţie 250 mg % uree; . — . — . — idem, cu 15 ml apă în loc de uree; ..... 10 ml soluţie 1 mmol/ml indol + 5 ml acid fosforic 85% + 0,2 ml soluţie 0,5% nitrit, adus la 20 ml; — — — — 20 ml urină + 2 ml acid fosforic 85% + 0,1 ml soluţie 0,5 % nitrit; probele s-au citit la fotocolorimetrul Visomat, primele două cu filtre verzi, ultimele cu filtre albastre, faţă de apă.

extractibilă în alcool izoamilic şi care nu are un maxim de absorbţie net în domeniul 420—600 mμ. Soluţiile de triptofan, cu concentraţii între 0,4—30 μ mol/ml, dau coloraţii proporţionale cu concentraţia aminoacidului (fig. 3).

Acidul 3-indolilacetic dă, în condițiile de lucru specificate, o coloraţie roşie; R. Jouault [10] a remarcat că această coloraţie e fugace şi o socoteşte deci improprie pentru determinări cantitative. Adăugînd însă în prealabil în probe uree pură, am reuşit stabilizarea coloraţiei (fig. 4), care trece practic cantitativ în izo- şi n-butanol şi alcool izoamilic, dar nu trece în cloroform din mediul acid şi e proporţională cu concentraţia iniţială a acidului 3-indolilacetic, între 0,4—2,0 μ mol/ml (fig. 3).

Indolul dă de asemenea o coloraţie roşie cu nitritul în mediu acid, proporţională cu concentraţia sa, între 0,1—0,6 μ mol/ml; peste această valoare nu am mai obţinut rezultate reproductibile, probabil din cauza insolubilităţii colorantului, care prezintă tendinţa de precipitare.

Coloraţia e stabilă şi nu pare a fi influenţată de un exces de nitrit.

Serotonina (5-hidroxitriptamin-creatininsulfat, SERVA) dă de asemenea o coloraţie roşie-violetă, trecînd imediat în roşu-brun, proporţională cu concentraţia sa, între 0,3—1,5 μ mol/ml. Valorile se situează foarte bine pe curba obţinută cu acidul 3-indolilacetic.

S-au preparat extracte în izobutanol din soluţii de indol şi acid 3-indolilacetic tratate în prealabil cu nitrit în mediu fosforic, iar spectrele lor în domeniul vizibil au fost comparate cu cele ale extractelor izobuta-

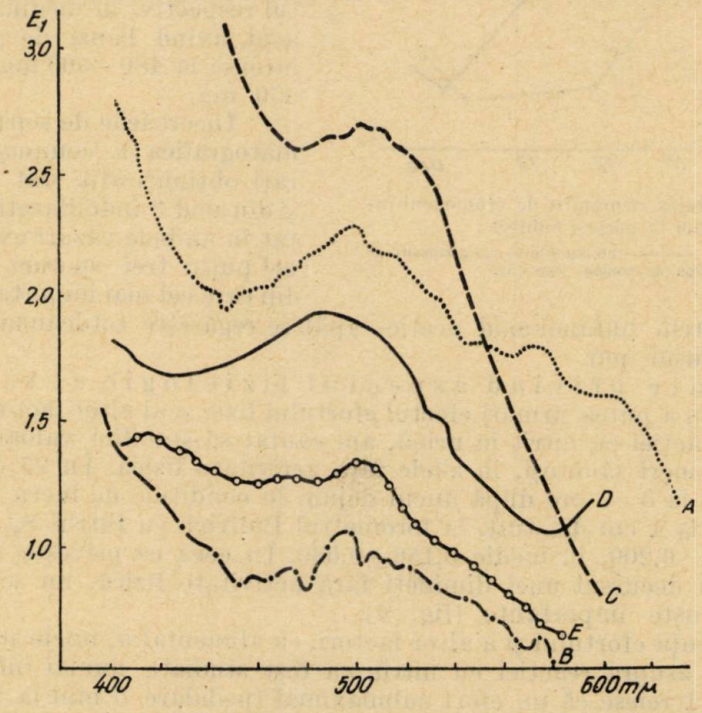


Fig. 5. — Spectrele de absorbţie în vizibil ale extractelor în izobutanol, după reacţia cu nitrit în mediu fosforic, pentru:

A — urină de la bolnavi cu afecţiune gastrointestinală acută; *B* — urină normală de repaos; *C* — acid 3-indolilacetic; *D* — indol; *E* — urină de efort (înot 400 m liber); citire la spectrofotometrul SF-4, faţă de izobutanol saturat cu apă.

nolice de urini de diferite proveniențe, tratate identic. Colorația obținută cu indolul prezintă variații destul de mari în urma unor modificări încă nestudiate ale condițiilor de lucru. În prezent am găsit două varietăți de colorant (cu absorbție maximă la 510 mμ și respectiv 490 mμ, ultimul redat în figura 5). Menționăm că toate curbele au fost obținute cu soluții de același ordin de vechime (5—6 zile de la preparare), știut fiind că spectrele coloranților din această categorie se modifică în timp, cu deplasarea maximei spre roșu [20]. Soluția recent preparată cu acid 3-indolilacetic are un maxim de absorbție la 510—512 mμ, cu o inflexiune la 525 mμ și un minim mult mai pronunțat la 460 mμ; maxima corespunde cu cea găsită de W. Fearon și W. Boggust la colorantul bază liberă [14], sulfatul respectiv, în mediu puternic acid, avînd benzi de absorbție intense la 480—500 mμ și 530—550 mμ.

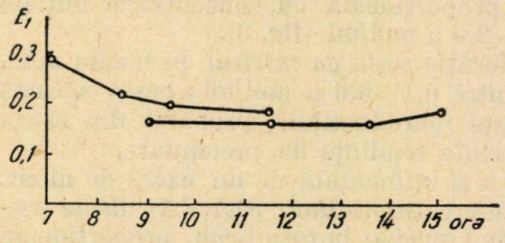


Fig. 6. — Variația eliminării de cromogeni indolici la doi subiecți normali, fără activitate fizică.

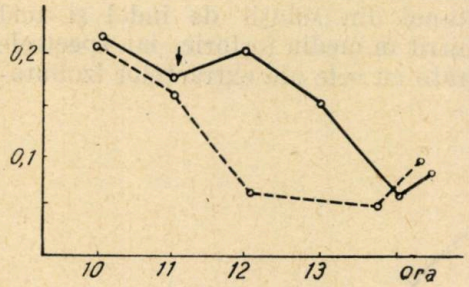


Fig. 7. — Variația eliminării de cromogeni indolici la același subiect :
– – – – control; ——— cu ingestie de 2,5 g/kilocorp de pulpă de banane (săgeată).

Încercările de separare cromatografică a compușilor colorați obținuți atît din urină cît și din acid 3-indolilacetic au arătat în ambele cazuri existența a cel puțin trei spoturi colorate, din care cel mai important (R_j = 0,98 în sistem butanol-acid acetic- apă) se regăsește totdeauna în urină și în produsul pur.

4) Date privind aspectul fiziologic al reacției

Pentru a putea urmări efectul efortului fizic și al altor factori asupra evoluției reacției cu nitrit în urină, am căutat să stabilim valoarea „normală", la tineri sănătoși, în zilele fără activitate fizică. În 25 de cazuri am obținut la 3—5 ore după micul dejun, în condițiile de lucru indicate, o extincție la 1 cm de strat, la fotometrul Pulfrich cu filtrul S_{47}, variind între 0,096—0,200, în medie 0,156±0,030. În ceea ce privește dinamica valorilor în decursul unei dimineți fără activitate fizică, nu se observă variații bruște importante (fig. 6).

Influența efortului și a altor factori, ca alimentația, unele stări patologice etc., asupra reacției cu nitrit au fost studiate numai informativ. Din tabela 1 reiese că un efort submaximal (pedalare 5 min la veloergometru) sau afecțiunile gastrointestinale legate de exaltarea fenomenelor de putrefacție intestinale determină creșterea statistic semnificativă a valorilor reacției, pe cînd la un grup arbitrar ales de normali diferența nu este semnificativă.

După ingestia de pulpă de banane, aliment care conține o proporție relativ mare de 5-hidroxitriptamină [21], valoarea reacției în urină prezintă o creștere vizibilă (fig. 7).

Tabela 1

Reacția cu nitrit de sodiu în efort și unele afecțiuni gastrointestinale

Grupa	Nr. subiecților	Medie $\pm\sigma$	Diferența față de prima grupă	Semnificația diferenței
Normali	10	$0{,}153\pm0{,}034$	—	—
Normali	7	$0{,}163\pm0{,}0186$	0,010	$p \geqslant 0{,}1$
Efort submaximal	9	$0{,}217\pm0{,}037$	0,064	$p \sim 0{,}01$
Afecțiuni gastrointestinale	5	$0{,}340\pm0{,}070$	0,187	$p \sim 0{,}001$

S-au mai observat valori mari în urma ingerării de extract tiroidian după o noapte de veghe, în stările subiective de oboseală.

Modificările cele mai importante se produc însă în cazul efectuării unor eforturi intense sau de durată. Ultimul caz a fost studiat de V. Achim și colaboratori [1], la ciclişti. În privința efortului intens, am urmărit evoluția valorilor reacției la boxeuri. În figura 8 se poate observa o creștere spectaculară a cromogenilor indolici, care începe chiar în timpul efortului și atinge valoarea maximă la jumătate de oră după încetarea lui, în același moment cu albuminuria maximă. Deși există apoi o tendință netă de scădere, valoarea dinaintea efortului nu e atinsă nici după o oră și jumătate.

Singurul tip de efort la care am găsit scăderea valorilor la unii subiecți este înotul; în aceste cazuri însă, diureza crește pînă la 4—6 ml/kg corp/oră, iar produsul extincției cu diureza în ml/min, care oglindește cantitatea de cromogen eliminată pe unitatea de timp, este mult mai mare decît la martori în repaus.

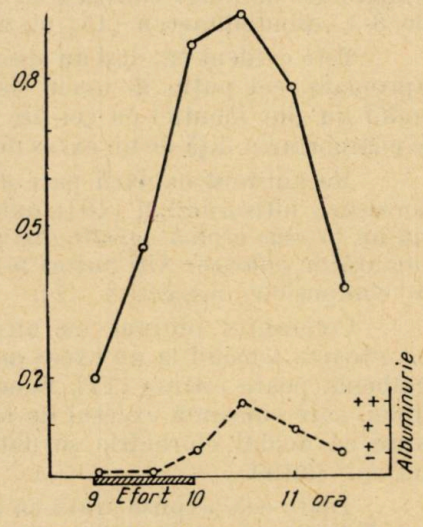


Fig. 8. — Modificarea eliminării de cromogeni indolici în efort. Subiectul M., 14 ani; antrenament de box, sfîrșit cu 2 reprize a 3 minute în ring:
– – – – albuminuria, estimată cu reactiv Essbach;
——exctincția probelor: 5 ml urină +2,5 ml H_3PO_4 + 1 picătură soluție 0,5% $NaNO_2$, față de probe fără nitrit, cu filtrul 847.

DISCUȚII

Problema reacției cu nitrit acid în urină este destul de complexă și, cu toate că a fost relativ mult cercetată, ea nu poate fi socotită ca rezolvată în toate detaliile. În special în lucrările mai vechi există multă

confuzie în privința compușilor implicați [4], [5] și datele lor trebuie interpretate cu atenție. Admițînd că reacția ar fi dată exclusiv de compușii cu nucleu indolic, în urina umană există cel puțin 30 de astfel de compuși [3], a căror eliminare variază — foarte probabil — diferit în diverse stări fiziologice sau patologice.

Printre substanțele care dau în mod cert reacția, se află acidul 3-indolilacetic, indolul, scatolul, triptofanul, 5-hidroxitriptamina (verificate de noi), uroeritrina [12] și urocromul [5], compuși încă puțin cunoscuți, acidul 3-indolilaceturic [17] și 3-indolilpropionic [22], 7-hidroxiindolul și acidul 7-hidroxi-3-indolilacetic [16]. Foarte probabil că o reacție de culoare asemănătoare pot da triptamina și acidul 5-hidroxiindolilacetic.

Problema se complică încă prin faptul că unul și același compus poate da în reacție mai multe substanțe colorate, din care unele nu sînt stabile în timp. Lucrînd în condiții diferite de ale noastre, H. Dobeneck [7] a obținut, prin cromatografierea pe Al_2O_3 a coloranților rezultați din tratarea cu nitrit acid a acidului 3-indolilacetic, tot trei zone bine distincte, dintre care cea a urorozeinei (λ max. 510—530 mμ în alcool amilic) e nestabilă în timp.

Urorozeinei i s-au atribuit structuri destul de diferite, fără a i se putea fixa definitiv constituția. Nici presupunerea plauzibilă că e vorba de 3-3′- diindolilmetan [15] nu a fost confirmată recent [7].

Este evident că, deși au spectre asemănătoare [14] și valori R_f foarte apropiate, cel puțin în unele sisteme de irigare, coloranții rezultați din indol nu sînt identici cu cei din acidul 3-indolilacetic, extincția specifică și comportarea față de un exces de nitrit fiind net diferite.

Mecanismul oxidării pare a fi specific nitritului, cu toate că nu se formează nitrozoindoli [10]; oxidarea cu $FeCl_3$ a acidului 3-indolilacetic dă un produs cromatografic distinct de cel obținut cu nitrit, avînd și altă nuanță de culoare. Alți autori notează de asemenea o comportare diferită a compușilor respectivi [7].

Colorantul obținut cu nitrit din acid 3-indolilacetic (urorozeina) este foarte sensibil la un exces de nitrit, trecînd în alt compus, de culoare galbenă, poate isatina [14]. Fenomenul poate fi împiedicat prin prezența ureei, care consumă excesul de reactiv. Rezultatele nesatisfăcătoare obținute cu acidul clorhidric se datoresc probabil tot oxidării colorantului format inițial.

Toate cele expuse arată că reacția cu nitrit în urină nu poate fi deocamdată interpretată strict cantitativ, deoarece e dată de cantități variabile de cromogeni diferiți. Credem totuși că urmărirea eliminării cromogenilor indolici prin urină prezintă un oarecare interes, deoarece aceștia reflectă, sub unele aspecte cel puțin, intensitatea metabolismului triptofanului; se admite într-adevăr că degradarea tisulară a triptofanului are un rol important în eliminarea acidului 3-indolilacetic [6], principalul cromogen al reacției cu nitrit.

În cercetări pe sportivi, J. Kral [18] a găsit că, după efort, acest acid se elimină în proporție mai mare la 23 din cei 28 de subiecți studiați;

metoda folosită de acest autor este laborioasă și permite doar o estimare semicantitativă, însă este foarte specifică.

Alți autori mai semnalează că în urma efortului crește eliminarea acidului xanturenic [11], un alt produs de degradare a triptofanului.

În aceste condiții, reacția urorozeinei își justifică utilizarea în cercetări la sportivi, ca probă de laborator pentru urmărirea unui aspect al metabolismului proteic, plecînd de la premiza logică că intensitatea degradărilor tisulare și — implicit — eliminarea de cromogeni indolici vor fi cu atît mai reduse, cu cît sportivul va fi mai bine antrenat (mai exact, cu cît organismul său se va adapta mai bine unui efort dat).

Dintre ceilalți factori care determină creșterea valorilor reacției, neoplaziile gastrice [19], subnutriția [2], starea febrilă [10] și tulburările gastrointestinale acute sînt incompatibile cu activitatea sportivă de performanță. Este interesant de subliniat că, deși se afirmă că în putrefacțiile intestinale exagerate se produc în special indolul și scatolul, care se elimină apoi ca acizi indoxil- și scatoxilsulfuric, s-a pus în evidență și în acest caz, experimental pe șobolan, o creștere remarcabilă a eliminării acidului 3-indolilacetic [23]. M. B o l o t o v a semnalat pe de altă parte o creștere a eliminării urocromului în carcinomul gastric, în intoxicațiile alimentare și în lezările de țesuturi [13].

Hrana prea bogată în triptofan sau 5-hidroxitriptamină face de asemenea să crească eliminarea de cromogeni indolici, însă medicului de cantonament îi sînt cunoscute compoziția și cantitatea alimentelor, încît acest lucru nu constituie un impediment serios.

Valori eronat scăzute ale reacției — în condițiile de lucru date — se obțin atunci cînd urina conține inițial nitriți, de origine alimentară sau apăruți în urma infecției căilor urinare cu diverse bacterii [8]. Aceste cazuri, de altfel destul de rare, pot fi depistate prin faptul că extincția soluției martor față de apa distilată e neobișnuit de mare, în timp ce aceea a probei față de martor e aproape nulă.

În încheiere, menționăm existența la cele cîteva cazuri studiate a unui paralelism foarte net între eliminarea cromogenilor indolici și aceea a mucoproteinelor care dau reacția lui Donaggio, atît în repaus cît și în efort. După cum se știe, mucoproteinuria traduce dezechilibrul între procesele anabolice și cele de degradare a substanței fundamentale din țesutul conjunctiv [24], astfel că paralelismul amintit ar constitui un argument în favoarea presupunerii că urmărirea eliminării de cromogeni indolici prin proba simplă descrisă ar permite obținerea de informații interesante privind intensitatea degradării proteinelor tisulare în efort.

CONCLUZII

1. Urmărirea unor aspecte ale reacției cu nitrit de sodiu în urină a permis punerea la punct a unui procedeu fotometric de apreciere a rezultatelor, mai precis și mai sensibil decît cel de estimare vizuală [1] și mult mai simplu decît separarea — în vederea dozării — a substanțelor

responsabile de apariția culorii; în acest fel se pot efectua numeroase serii de determinări, în condițiile unui cantonament sportiv.

2. Colorația fiind dată de un amestec de cromogeni în cantități diferite, denumirea de „reacție pentru cromogenii indolici" este mai potrivită decît cea de „reacție a urorozeinei", care are la origine acidul 3-indolilacetic; acest compus pare a fi însă principalul implicat în reacție.

3. Efortul fizic intens determină creșteri semnificative ale valorilor reacției și creșteri ale cantității de cromogeni eliminate în unitatea de timp. Aceste modificări pot fi puse în seama intensificării procesului de degradare a proteinelor tisulare, urmată de eliminarea de metaboliți ai triptofanului. În acest sens reacția își justifică aplicarea în controlul medico-sportiv ca indice al „uzurii proteice" în efort.

Secția de fiziologie a laboratorului de cercetări științifice, Institutul de cultură fizică, București

Prezentată la redacție la 4 octombrie 1961

РЕАКЦИЯ УРОРОЗЕИНА ПРИ ФИЗИЧЕСКОМ УСИЛИИ

РЕЗЮМЕ

В работе применен простой фотометрический метод для исследования некоторых вопросов, связанных с реакцией уророзеина (цветная реакция с нитритом в кислой среде, в моче). Окраска, соответствующая закону Ламберта-Беера, сравнивалась с окраской, полученной для некоторых чистых производных индола (индол, скатол, 3-индолуксусная кислота, 5-гидрокситриптамин и триптофан). Результаты подтверждают гипотезу, согласно которой 3-индолуксусная кислота играет важную роль в данной реакции.

У здоровых особей во время отдыха интенсивность реакции не представляет значительных резких изменений, тогда как различные типы физического усилия вызывают значительное повышение этой интенсивности.

Реакция уророзеина представляет некоторый интерес при исследованиях спортсменов, как указание на обмен триптофана, а, следовательно, на интенсивность деградации тканевых белков при усилии.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Влияние количества кислоты на реакцию уророзеина.

А — 20 мл мочи и различные количества 85 % фосфорной кислоты, доведенные до одинакового объема: определения проводились, по сравнению с водой, в фотоколориметре „Висомат" с синими фильтрами.

В — Та же система с 0,15 мл 0,5 % - го раствора азотистокислого натрия; определения проводились по сравнению с соответствующими пробами без азоти-

стокислого натрия, через 15 минут после приготовления. Экстинкция остается практически постоянной — 0,118 ± 0.0079.

Рис. 2. — Применяемость закона Ламберта-Беера при реакции уорозеина. Ex — Различные растворы изобутаноловых экстрактов нормальной мочи, в которой проводилась реакция (100 % — неразбавленный раствор).

U — Различные количества мочи. Определения проводились при помощи фотометра Пульфриха с фильтром S47.

Рис. 3. — Соотношение между интенсивностью окраски с нитритом в фосфорнокислой среде и концентрацией для: *A* — индола; *B* — индолуксусной кислоты (к пробам добавляли 20 мг мочи) и 5-гидрокситриптамина; *C* — триптофана. Определения проводились через 10—15 минут на фотометре Пульфриха с фильтром S47. Результаты представляют среднюю 4—5 определений.

Рис. 4. — Эволюция окраски во времени:

———— 2 мл раствора 250 мг % 3-индолуксусной кислоты + 3 мл 89 %-ой фосфорной кислоты + 1 мл раствора 0,5 % азотистокислого натрия + 15 мл раствора 250 мг % мочевины.

.—.—.—.— то же, вместо мочевины добавляют 15 мл воды.

.....10 мл раствора, содержащего 1м мол/мл индола + 5 мл фосфорной кислоты 85 % + 0,2 мл раствора 0,5 % азотистокислого натрия, доведенных водой до 20 мл.

— — — — 20 мл мочи + 2 мл 85 %-ой фосфорной кислоты + 0,1 мл раствора 0,5 %-го азотистокислого натрия. Определения проводили на фотоколориметре „Висомат", первые два с зелеными фильтрами, а последние с синими, по сравнению с водой.

Рис. 5. — Спектры поглощения в видимой области изобутаноловых экстрактов, после реакции с азотистокислым натрием в фосфорнокислой среде:

A — Моча больных острым желудочно-кищечным заболеванием.

B — Нормальная моча при отдыхе.

C — 3-индолуксусная кислота.

D — Индол.

E — Моча после усилия (плавание 400 метров свободным стилем).

Определения проводились на спектрофотометре, SF-4, по сравнению с изобутанолом, насыщенным водой.

Рис. 6. — Изменение выделения индоловых хромогенов, у двух здоровых людей, не подвергавшихся физической нагрузке.

Рис. 7. — Изменение выделения индоловых хромогенов у той же особи:

— — — — контроль;

———— после дачи 2,5 г/кг веса пульпы банана (стрелка);

Рис. 8. — Изменение выделения индоловых хромогенов при усилии. Больной М, 14 лет: тренировка бокса, с последующими двумя раундами по три минуты:

— — — — — альбуминурия, определенная реактивом Эссбаха;

———— экстинция проб: 5 мл мочи + 2,5 мл H_3PO_4 + 1 капля раствора 0,5 % азотистокислого натрия, по сравнениею с пробами без нитрита, с фильтром S47.

LA RÉACTION DE L'UROROSÉINE AU COURS DE L'EFFORT PHYSIQUE

RÉSUMÉ

Utilisant un procédé photométrique simple, l'auteur a étudié plusieurs problèmes en relation avec la réaction de l'uroroséine (réaction de couleur au nitrite, en milieu acide, dans l'urine). La coloration, qui respecte la loi de Lambert-Beer, a été comparée à celle donnée par certains pro-

duits indoliques purs (indol, scatol, acide 3-indol-acétique, 5-hydroxytryptamine et tryptophane). Les résultats obtenus confirment l'hypothèse suivant laquelle l'acide 3-indol-acétique a un rôle important dans cette réaction.

Chez les sujets sains, la valeur de la réaction ne présente pas, au repos, des modifications brusques importantes, tandis que les différents types d'effort physique déterminent une augmentation considérable des valeurs.

La réaction de l'ururoséine présente un certain intérêt pour les recherches concernant les sportifs. Elle représente un indice du métabolisme du tryptophane et, implicitement celui de la dégradation des protéines tissulaires pendant l'effort.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Influence de la concentration en acide sur la réaction de l'ururoséine.

A : 20 ml d'urine et des quantités variables d'acide phosphorique à 85 %, ramené au même volume ; lecture par rapport à l'eau (en tant qu'étalon) au photocolorimètre de Visomat, à filtres bleus).

B : même système, on y ajoute en plus 0,15 ml sol. à 0,5 % de $NaNO_2$; lecture par comparaison aux tests correspondants sans nitrite, 15 minutes après la préparation. L'extinction est pratiquement constante, de $0{,}118 \pm 0{,}0079$ g.

Fig. 2. — L'étendue de l'application de la loi de Lambert-Beer à la réaction de l'ururoséine.

Ex : dilutions d'extraits isobutanoliques des urines normales, dans lesquelles on a effectué la réaction (100 % = non-dilué). U = quantités variables d'urine.

Lecture au photomètre de Pulfrich, à filtre S 47.

Fig. 3. — La relation entre l'intensité de la coloration au nitrite, en milieu phosphorique, et la concentration établie pour les éléments suivants : *A* = indol ; *B* = acide indolacétique (on a ajouté à chaque échantillon 20 mg d'urée et de la 5-hydroxytriptamine) ; *C* = tryptophane.

Lecture après 10—15 minutes, au photomètre de Pulfrich, filtre S 47. Les résultats expriment les valeurs moyennes de 4—5 déterminations.

Fig. 4. — Le développement de la coloration en fonction du temps :

Trait plein : 2 ml sol. à 250 mg % d'acide 3-indolacétique + 3 ml d'acide phosphorique à 89 % + 1 ml sol. à 0,5 % de nitrite + 15 ml sol. à 250 mg % d'urée.

Point tiret : Idem, avec 15 ml d'eau à la place de l'urée.

Pointillé : 10 ml sol. 1 mMol/ml d'indol + 5 ml d'acide phosphorique à 85 % + 0,2 ml sol. à 0,5 % de nitrite, porté à 20 ml.

Tirets : 20 ml d'urine + 2 ml d'acide phosphorique à 85 % + 0,1 ml sol, à 0,5 % de nitrite.

La lecture des tests s'est effectuée au photocolorimètre de Visomat (prenant l'eau pour étalon), avec filtres verts pour les premières, filtres bleus pour les dernières.

Fig. 5. — Les spectres d'absorption, en visibilité, des extraits en isobutanol, après la réaction au nitrite en milieu phosphorique, dans :

A — les urines des malades à affections gastro-intestinales aiguës ; *B* — les urines normales de repos ; *C* — l'acide 3-indolacétique ; *D* — l'indol ; *E* — les urines d'effort (nage 400 m, style libre). Lecture au spectrophotomètre SF-4, par rapport à la solution d'isobutanol saturée d'eau.

Fig. 6. — Variations de l'élimination des chromogènes indoliques chez deux sujets normaux, sans activité physique.

Fig. 7. — Variations de l'élimination des chromogènes indoliques chez le même sujet : tirets ; contrôle, trait plein : après ingestion de pulpe de banane à raison de 2,5 g/kilo de poids corporel (flèche).

Fig. 8. — Les modifications de l'élimination de chromogènes indoliques pendant l'effort. Sujet M., 14 ans ; entraînement de boxe, à la fin de deux reprises de 3 minutes chacune sur le

ring; tirets = albuminurie, déterminée au tube d'Essbach. Trait plein = extinction des tests : 5 ml d'urine + 2,5 ml de H_3PO_4 + 1 goutte de sol. à 0,5% de $NaNO_2$ par comparaison aux tests sans nitrite; avec filtre S 47.

BIBLIOGRAFIE

1. T. CRIȘAN, V. ACHIM, C. DEAC, E. FLOREA, I. LITAN, M. OȚELEANU, N. CHICOMBAN, N. VOICA, *Considerații asupra reacției cu azotit de sodiu ca test de efort*, A IV-a sesiune pe țară a secției de med. sport. a Soc. șt. med., București, 27—28 mai, 1960, rezumat, p. 12.
2. S. CUPCEA, V. GALEA, E. POPESCU, Lucr. ses. gen. șt. a Acad. R.P.R., 2—12 iunie, 1950, p. 1454.
3. M. ARMSTRONG, K. SHAW, M. GORTATOWSKI, H. SINGER, J. Biol. Chem., **232**, 17 (1958).
4. F. RATHÉRY, în *Traité de Physiologie normale et pathologique*, Masson & Cie, Paris, 1939, III, 620—621.
5. M. RANGIER, P. de TRAVERSE, C. Rend. Acad. Sc., **207**, 1073, 1257 (1938).
6. H. WESSBACH, W. KING, A. SJOERDSMA, S. UDENFRIEND, J. Biol. Chem., **234**, 81 (1959).
7. H. VON DOBENECK, Z. Physiol. Chem., **304**, 26 (1956).
8. H. KOEPE, W. WAHL, Z. Klin. Med., **154**, 587 (1957).
9. FISCHER, citat de Z. PROCHÁZKA, în *Cromatografia pe hîrtie*, traducere, Ed. tehnică, București, 1960, 588.
10. R. JOUAULT, *Essai de dosage physico-chimique de l'acide indol-acétique*, thèse, Fac. Pharmacie, Paris, fără an.
11. V. PELIKAN, comunicare la al XIII-lea Congres al F.I.M.S., *Recherches concernant le métabolisme du tryptophane au cours de l'effort*, rezumat în Sportärztl. Praxis, no. *3/4* (1960).
12. M. WEISS, Deutsche. Arch. Klin. Med., **177**, 97 (1960).
13. М. Болотов, *Вопросы Питания*, **15**, 44 (1956).
14. W. FEARON, W. BOGGUST, Biochem. J., **46**, 62 (1950).
15. J. HARLEY MASON, J. BU'LOCK, Biochem. J., **51**, 430 (1952).
16. K. ICHIHARA, Y. SAKAMOTO, J. Biochemistry, **43**, 619 (1956).
17. P. DECKER, Z. Ges. Inn. Med., **9**, 966 (1954).
18. J. KRAL, Biochim. Biophys. Acta, **19**, 169 (1956).
19. M. WEISS, Z. Krebsforsch., **56**, 343 (1949).
20. V. ARNOLD, Z. Physiol. Chem., **71**, 1 (1911).
21. P. CARTIER, J. MOREAU, Y. GEOFFROY, C. Rend. Soc. Biol., **152**, 902 (1958).
22. P. DECKER, Naturwiss., **44**, 330 (1957).
23. R. DONALDSON, H. DOLCINI, S. GRAY, Amer. J. Physiol., **200**, 794 (1961).
24. P. BUGARD, Ann. Biol. Clinique, **16**, 539 (1958).

CAPACITATEA DE TRANSAMINARE A FICATULUI ÎN CURSUL PROCESULUI NEOPLAZIC

DE

FLORICA MOȚOC și SMARANDA CONSTANTINESCU

În ceea ce privește etiologia cancerului, după ultimele cercetări, ea trebuie căutată în acei catalizatori celulari, care dirijează sinteza numeroaselor enzime specifice de natură proteică. Acești catalizatori sînt polinucleotide citoplasmatice sau nucleare, care conțin diverse sisteme enzimatice, prin care se transmit caracteristicile biochimice ereditare.

Ținînd seama de aceste considerente s-ar părea deci, că problema se reduce la un studiu profund și amănunțit al acestor edificii arhitecturale complexe, cum sînt proteinele. De asemenea trebuie subliniat faptul că, în procesul de sinteză a aminoacizilor — constituenți de bază ai complexelor proteice — și ai proteinelor, intervin aceleași mecanisme fundamentale ca și în procesul de degradare. Aceste mecanisme sînt: aminarea reductivă, desaminarea oxidativă și transaminarea.

Datorită mecanismului de transaminare catalizat de aminoferaze, așa cum le-a numit A. E. Braunstein și M. G. Kriţman [1], [2], [4], organismul are posibilitatea să-și modifice concentrațiile diferiților aminoacizi și ale acizilor cetonici, corespunzător nevoilor specifice fiecărui țesut [11].

Bazați pe aceste fapte am căutat să urmărim mecanismul transaminării în evoluția procesului canceros experimental, pentru a obține unele indicații asupra metabolismului proteic și dacă aceste modificări ar putea servi ca metodă de diagnostic în depistarea stărilor precanceroase.

În acest scop am utilizat ca animal de experiență șobolani aproximativ de aceeași vîrstă și greutate. Animalele au fost împărțite în două loturi. Primul lot alcătuit din 40 de șobolani a primit în afară de hrana obișnuită, o soluție uleioasă de *p*-dimetilaminobenzen 4,5 g% în așa fel încît fiecărui animal i s-a administrat zilnic 45 mg substanță activă

pe kg corp. Animalele din al doilea lot, au primit ulei fără *p*-dimetil-aminobenzen.

Pentru a urmări modificările mecanismului de transaminare în evoluția procesului neoplazic, animalele au fost sacrificate la diferite intervale de timp prin decapitare. Imediat după sacrificare, ficatul a fost prelevat și triturat (1 g țesut proaspăt + 9 ml soluție Ringer). Din acest homogenat s-a luat 1 ml pentru dozări.

Tabela 1

Variația GOT și GPT în funcție de intensitatea leziunii morfologice

Numărul animalelor	Tratament cu *p*-dimetil-aminoazo-benzen	Intensitatea leziunii	Valoarea rezultatelor	GOT	GPT
				exprimate în γ acid piruvic la 1 g țesut proaspăt	
10	—	normali	maximă	39,00	40,50
			minimă	27,50	33,20
			medie	32,40	37,30
10	Tratament zilnic	±	maximă	43,50	20,20
			minimă	29,30	11,00
			medie	35,80	14,90
10	,,	+	maximă	41,60	41,20
			minimă	32,50	25,40
			medie	36,80	30,00
10	,,	++	maximă	48,10	28,80
			minimă	30,00	12,70
			medie	43,20	15,30
10	,,	+++	maximă	65,10	12,20
			minimă	48,30	8,30
			medie	59,00	10,50

Determinările de glutamic-oxaloacetic-transaminază (GOT) și glutamic-piruvic-transaminază (GPT) s-au făcut simultan după metoda P. Bruyet și colaboratori [5], [6], [7] inspirată de lucrările lui N. E. Tonhazy și colaboratori [13] B. Bonati și colaboratori, [3], A. Karmen și colaboratori [10].

Metoda se bazează pe dozarea acidului piruvic format în cele două reacții. Cantitatea de acid piruvic rezultat este în funcție de activitatea celor două transaminaze existente în țesutul hepatic.

Acidul piruvic trecut sub formă de hidrazonă în mediu alcalin, dă un complex de culoare brun-roșcată, care este fotocolorimetrat în vizibil utilizînd filtrul S_{50} pentru lungimi de undă cuprinse între 4350 și 4800 Å.

Extincțiile citite s-au raportat la o curbă etalon, care s-a obținut prin acțiunea reactivului (2-4 dinitrofenilhidrazină) asupra unor cantități cunoscute de acid piruvic.

Activitatea transaminazică este exprimată în γ de acid piruvic eliberat de 1 g țesut proaspăt în 20 min la 37°C.

Pentru a urmări mai ușor evoluția activității transaminazice în procesul de cancerizare al ficatului, am grupat rezultatele obținute (tabela 1) pe etape, corespunzătoare la un anumit grad de leziune și am făcut mediile, deoarece nu am obținut rezultate superpozabile. Aceasta fără îndoială este datorită rezistenței animalului care joacă un rol important în procesul evolutiv al bolii.

Din tabela 1 se constată că viteza mecanismului de transaminare care transportă gruparea aminică pe acidul oxaloacetic crește în mod progresiv cu evoluția leziunii produsă de noxa cancerigenă. În schimb reiese că ritmul procesului de transaminare care transportă gruparea aminică pe acidul piruvic, atinge un minim în prima etapă corespunzătoare instalării leziunii morfologice, ca după aceea să înceapă să crească atingînd un maxim în etapa a doua unde leziunea morfologică se accentuează mai mult. În etapele a treia și a patra corespunzătoare hepatomului transaminaza GPT începe să scadă către un minim.

Rezultatele obținute de noi sînt în concordanță cu cele din literatură [8], [12], [14], [15], [16], [17], [18], însă spre deosebire de ceilalți autori, după cum am mai arătat mai sus, am căutat să urmărim evoluția leziunii biochimice și în stadiul precanceros și să vedem dacă valorile suferă modificări importante.

În celula în curs de cancerizare și mai tîrziu în celula canceroasă, se constată o creștere treptată a activității GOT, care în faza neoplazică ajunge aproape la valoarea dublă. Aceasta s-ar putea explica astfel: metabolismul carbohidraților în cursul acestui proces este alterat în așa fel, încît glucoza — din depozitul ei sub formă de glicogen — este transformată aproape în întregime și degradată la acid lactic [18]. Scăderea acestui material — glicogenul — [9], bogat în energie, ar avea ca urmare modificarea metabolismului celular în sensul adaptării la sinteza și la creșterea proteinelor prin mărirea activității GOT.

Creșterea activității GOT pare să fie un indiciu al evoluției procesului neoplazic al ficatului sau mai bine zis al funcției celulei hepatice în acest proces .

În schimb, din rezultatele obținute asupra sistemului transaminazic GPT, care prezintă minime și maxime, nu s-a putut preciza deocamdată o corespondență între valorile obținute și etapa procesului neoplazic.

În concluzie, din datele experimentale obținute se constată că intensificarea leziunii histologice se reflectă și asupra evoluției normale a mecanismului procesului de transaminare, în sensul că, cu cît leziunea crește în intensitate, cu atît crește și valoarea GOT atingînd un maxim în stadiul canceros.

În cazul GPT nu s-a observat o corespondență paralelă în același sens între fenomenul histologic și cel biochimic, fapt care ne îndreptățește să credem că explorarea funcțională a parenchimului hepatic constituie încă o preocupare care necesită o mare prudență în ceea ce privește

interpretarea rezultatelor, din cauza funcției complexe și rolului important pe care îl are glanda hepatică în organism.

Laboratorul de chimie al Institutului „Dr. V. Babeș", București

Prezentată la redacție la 25 octombrie 1961

СПОСОБНОСТЬ ТРАНСАМИНИРОВАНИЯ ПЕЧЕНИ ВО ВРЕМЯ НЕОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

РЕЗЮМЕ

На группе, состоящей из 50 крыс (из которых 10 служили для контроля), авторы проследили за эволюцией деятельности щавелево-уксусной (GOT) и пировиноградной (GPT) трансаминазных систем в процессе ракового заболевания печени, вызванного парэнтеральным введением 4-диметил-аминоазобензола.

На основании полученных результатов были сделаны следующие выводы:

1. В клетке, в которой развивается раковый процесс, деятельность системы GOT постепенно возрастает; со временем, в раковой клетке, значение этой деятельности почти удваивается.

2. Деятельность системы GPT проходит через минимум и максимум во время эволюции неоплазматического процесса; в начальной стадии заболевания ее значение резко понижается.

LA CAPACITÉ DE TRANSAMINATION DU FOIE AU COURS DU PROCESSUS NÉOPLASIQUE

RÉSUMÉ

Sur un lot de 50 rats, dont 10 ont servi de témoins, les auteurs ont suivi l'évolution de l'activité des systèmes transaminasiques GOT et GPT pendant le processus de cancérisation du foie, engendré par administration parentérale de 4-diméthylaminobenzène.

Les résultats obtenus leur ont permis de constater que :

1° Dans la cellule en voie de cancérisation, l'activité du système GOT marque un accroissement graduel et, plus tard, dans la cellule cancéreuse, sa valeur atteint presque le double ;

2° L'activité du système GPT enregistre, au cours du processus néoplasique un minimum et un maximum, et à la phase d'installation de la lésion, sa valeur baisse remarquablement.

BIBLIOGRAFIE

1. BRAUNSTEIN A. E., KRITMAN M. G., Enzymologya, **2**, 129 (1937).
2. БРАУНШТЕЙН А. Е., КРИЦМАН М. Г., Биохимия, **3**, 590 (1938).
3. BONATI B., LACERENZA C., RANCATI C. B., TENCONI L. T., Minerva Med. (Torino), *147*, 267 (1956).
4. БРАУНШТЕЙН А. Е., *Биохимия аминокислотного обмена*. Издательство Академии Медицинских Наук СССР, Москва, 1949.
5. BRUYET P., BENEVENT A., Arch. malad. cœur et vaisseaux, *8*, 759 (1958).
6. BRUYET P., DELAUNAY A., Presse médicale, *90*, 2011 (1958).
7. BRUYET P., MEIGNIEN GAUTHIER CH., DELAUNAY A., Ann. de biol. clinique, **16**, *10—12*, 661 (1958).
8. DESSI P., PELLEGRINI R., Bull. Oncol., **31**, *6*, 745 (1957).
9. GEORGESCU L., MOTOC FLORICA, CONSTANTINESCU SMARANDA, *Aspecte biochimice şi histochimice în carcinogeneza hepatică* (lucrare comunicată la Secţia de morfologie, Timişoara, 20 mai, 1961).
10. KARMEN A., WROBLEWSKI F., LA DUE J. S., J. Clin. Invest., **34**, 126 (1955).
11. КРИЦМАН М. Г., КОНИКОВА А. С., Успехи Биохимической химии, I, 203 (1950).
12. SANTONI G., Ann. Obstet. Ginec., **78**, 10, 1099 (1956).
13. TONHAZI N. E., WHITE N. C., UMBREIT W. W., Arch. Biochem., **28**, *1*, 36 (1950).
14. WAISMAN H. A., MONDER C., WILLIAMS J., Cancer Res., *1614*, 344 (1956).
15. WLCZOK T., Excerpt. Med. Cancer. Sec. **XVI**, **8**, *11*, 1570 (1960).
16. WROBLEWSKI F., LA DUE J. A., Cancer. Philad., **8**, *6*, 1155 (1955).
17. WROBLEWSKI F., LA DUE J. S., Ann. Intern. Med., **43**, *2*, 345 (1955).
18. ZAMEENIK P. C., LATFIELD R. B., STEPHENSON M. L., STEELE J. M., Cancer Res., *11*, 592 (1951).

REPARTIȚIA TRANSAMINAZELOR PE FRACȚIUNILE ELECTROFORETICE ALE PROTEINELOR SOLUBILE DIN MITOCONDRIILE DE CREIER ȘI FICAT DE ȘOBOLAN

DE

C. ȘELARIU și S. MIHĂESCU

Majoritatea cercetărilor au arătat că mitocondriile au funcții biochimice asemănătoare, indiferent de proveniența celulelor din care au fost izolate. Deoarece în ultimii ani s-a stabilit că toate mitocondriile au aceeași structură, s-a ridicat problema explicării acestor asemănări funcționale și structurale. Astfel D. E. Green [1] consideră că toate mitocondriile au același schelet structural, alcătuit din asocierea unor proteine structurale cu lanțurile citocromice. Autorul presupune că aceste asocieri formează cea mai mică entitate funcțională a mitocondriilor. De ea se leagă labil o serie de enzime auxiliare, necesare ciclului citric, oxidării acizilor grași etc. Alături de acestea, în mitocondrii există și o cantitate oarecare de proteine solubile, cu diferite funcții enzimatice.

Prin distrugerea mitocondriilor, enzimele auxiliare solubile trec în soluție, iar scheletul structural proteic rămîne în partea insolubilă. În felul acesta, în soluție se găsesc atît proteinele solubile, cu diferite funcții enzimatice, cît și enzimele auxiliare legate labil de scheletul proteic al mitocondriilor.

Asemănarea dintre mitocondrii nu se limitează însă numai la scheletul structural proteic care alcătuiește această formațiune. Astfel, noi am arătat că și la nivelul proteinelor solubile se poate evidenția un fond proteic comun : lucrînd cu mitocondriile de creier și ficat, prin electroforeză pe hîrtie și șoc anafilactic am găsit că se pot stabili asemănări la nivelul unor fracțiuni proteice (fracțiunile 1 și 2 la creier, cu fracțiunile 1′ și 2′ la ficat) [2].

Deoarece am presupus că acest fond comun al proteinelor solubile ar putea fi reprezentat de proteine enzimatic active, eventual de enzimele auxiliare legate labil de scheletul proteic al mitocondriilor, în lucrarea de față am studiat comparativ repartiția unor enzime pe fracțiunile proteice

obţinute prin electroforeză. Era necesar însă ca enzimele luate în studiu, comune atît mitocondriilor de ficat cît şi celor de creier, să facă parte dintr-un proces metabolic general, să fie solubile şi să se găsească în cantitate suficientă pentru a putea fi determinate pe fracţiunile obţinute prin electroforeză pe hîrtie.

Ne-am oprit la transaminazele oxalacetică (GOT) şi piruvică (GPT), indicate ca fiind mitocondriale [3]. Ele îndeplinesc condiţiile de alegere arătate mai sus.

Separarea mitocondriilor, distrugerea lor, extracţia proteinelor solubile şi electroforeza pe hîrtie sînt descrise în lucrarea anterioară [2]. Determinarea transaminazelor (oxalacetică şi piruvică) s-a făcut prin metoda indicată de S. M. Idu şi colaboratori [4] [5], varianta metodei lui N. E. Tonhazi şi colaboratori [6], dar pentru colorimetrare am folosit fotometrul cu celulă FEK în locul fotometrului Pulfrich.

S-au făcut determinări pe extracte de proteine solubile mitocondriale, pe suspensii de mitocondrii distruse şi pe eluatele fracţiunilor electroforetice.

Electroforeza extractului proteic concentrat s-a făcut pe benzi de hîrtie Whatman nr. 1, de 4 cm lăţime. Din fiecare bandă s-a tăiat apoi longitudinal cîte 1 cm, care s-a colorat pentru proteine cu albastru de bromfenol 1%. O dată puse în evidenţă, fracţiunile proteice s-au decupat de pe benzile neprelucrate (se foloseau de obicei 4 benzi) şi s-au trecut fiecare în cîte o eprubetă. Eluţia proteinelor s-a făcut cu cîte 3 ml ser fiziologic pentru fiecare fracţiune, la rece, timp de 16—18 ore. Activitatea celor două transaminaze s-a determinat apoi pe cîte 1 ml din lichidul de eluţie al fiecărei fracţiuni în parte. S-a făcut un singur martor pentru ambele enzime. Iniţial, determinările s-au făcut pe toate fracţiunile, adică 9 la creier şi 8 la ficat. Din cauza concentraţiei proteice mici a ultimelor fracţiuni, acestea s-au contopit într-o singură probă, aşa încît efectiv s-a lucrat numai pe 6 probe atît la creier cît şi la ficat.

Rezultatele privind activitatea transaminazelor determinate pe extractul de proteine solubile mitocondriale şi pe suspensia de mitocondrii distruse sînt date în tabela 1 (exprimate în μg acid piruvic şi raportate la 1 g ţesut proaspăt), iar cele privind activitatea transaminazelor din lichidele de eluţie ale fracţiunilor de pe electroforegrame sînt date în tabela 2 (raportate la 1 ml eluat).

Tabela 1

Activitatea GOT şi GPT din proteinele solubile şi mitocondrii distruse (μg acid piruvic pe 1 g ţesut proaspăt)

Organul		GOT	GPT
Creier	proteine solubile mitocondriale	643	26
	mitocondrii distruse	2286	428
Ficat	proteine solubile mitocondriale	428	107
	mitocondrii distruse	371	485

Din tabela 1 se observă că, atît la creier cît și la ficat ambele enzime trec în proteinele solubile în cantitate suficientă pentru a putea fi determinate apoi pe fracțiuni. Nu am făcut spălări repetate ale mitocondriilor distruse, de aceea activitatea lor transaminazică mare s-ar putea explica prin capacitatea lor de a adsorbi transaminazele din soluție, mai ales că mitocondriile distruse formează mari suprafețe de adsorbție.

Tabela 2

Activitatea GOT și GPT pe eluatele fracțiunilor proteice (μg acid piruvic pe 1 ml eluat)

Formațiunile	Denumirea fracțiunilor	Procentul relativ	Mobilitatea $\times 10^{-5}$ cm²/s/V	Activitatea GOT	Activitatea GPT
Mitocondrii de creier	1	18,6	1,3	30 20 40 51 54	12 12 12 10 12
	2	11,8	1,6	52 65 83 86 88	— — — — —
	3	23,3	1,9	8 6 8 — —	— — — — —
	4	24,5	2,4	— — — — —	— — — — —
	5	10,8	2,8	— — — — —	— — — — —
	6,7,8,9	10,8	—	— — — — —	— — — — —
Mitocondrii de ficat	1′	19,1	1,3	98 56 51 125 65	10 — — — —
	2′	15,5	1,6	10 10 47 35 23	— 10 — 10 10
	3′	14,6	2,2	— — 12 14 —	— — 10 — —
	4′	14,0	2,6	— — — — —	— — — — —
	5′	22,3	3,0	— — — — —	— — — — —
	6′,7′,8′	14,5	—	— — — — —	— — — — —

Din tabela 2 se observă că activitatea enzimatică este repartizată în cazul GOT la creier și ficat pe aceleași fracțiuni, activitatea maximă pentru creier fiind însă pe fracțiunea 2, iar pentru ficat pe fracțiunea 1′. Deci, la ambele organe, două fracțiuni succesive cu mobilitate identică, au activitate GOT, dar maximum de activitate nu este pe aceeași fracțiune la creier și ficat. Rezultate asemănătoare pentru GOT la extractele proteice totale din ficatul de șobolan, au fost obținute și de alți autori [7], [8]. În privința GPT, tabela arată repartiția ei pe fracțiunea 1 la creier și pe fracțiunile 1′ sau 2′ sau chiar 3′ la ficat. Dar, cu toate fluctuațiile de repartiție la ficat, se observă totuși că fracțiunea 2′ este aceea care are activitate în majoritatea cazurilor. Deci, nici la GPT activitatea enzimei nu este pentru ambele organe pe aceeași fracțiune.

Într-o lucrare recentă [8], lucrîndu-se pe proteinele solubile mitocondriale s-a găsit pentru GOT maximum de activitate pe prima fracțiune electroforetică de lîngă start (A) și o activitate mult mai redusă pe fracțiunea alăturată (B); pe electroforegramele proteinelor solubile din supernatantul citoplasmatic, activitatea GOT este repartizată tot pe primele fracțiuni, dar în majoritate pe fracțiunea B și în cantitate mică pe fracțiunea A. Autorul ajunge la concluzia că în celula hepatică se găsesc două GOT, una mitocondrială care devine activă numai prin distrugerea mitocondriilor, și una citoplasmatică; enzimele se diferențiază și prin comportarea lor la diferite pH-uri și în timp.

Rezultatele noastre la ficat concordă cu concluziile de mai sus, deoarece fracţiunea 1′ ar corespunde fracţiunii A şi activitatea maximă GOT ar reprezenta enzima mitocondrială, iar fracţiunea 2′ ar corespunde fracţiunii B şi activitatea redusă ar reprezenta enzima din supernatantul citoplasmatic.

Se ridică întrebarea însă cum de apare o enzimă din supernatantul citoplasmatic în mitocondrii. Autorul de mai sus face abstracţie de ea deoarece activitatea găsită pe fracţiunea B în mitocondrii este foarte redusă. Activitatea găsită de noi este redusă, dar destul de mare pentru a nu putea fi neglijată.

În introducere am arătat însă că proteinele solubile totale obţinute după distrugerea mitocondriilor sînt formate din proteinele solubile intramitocondriale şi din proteinele eliberate de pe scheletul structural. Cum D. E. Green [1] presupune că proteinele solubile intramitocondriale sînt prelungiri citoplasmatice, activitatea GOT de pe fracţiunea 2′ reprezintă deci enzimă citoplasmatică. În felul acesta, în proteinele solubile mitocondriale de ficat sînt două GOT, una mitocondrială şi una citoplasmatică.

La creier, repartiţia enzimei pe fracţiunile 1 şi 2, cu activitate maximă pe 2, ar putea fi interpretată în acelaşi fel, ca existenţa a două transaminaze în mitocondrii, una mitocondrială şi una citoplasmatică.

Prin analogie cu ficatul, activitatea de pe fracţiunea 2 fiind mai mare, s-ar putea presupune că enzima localizată aici să fie cea mitocondrială.

Datele obţinute pentru activitatea GPT indică o comportare specifică şi pentru această enzimă, diferită la creier şi ficat.

În concluzie, am arătat că în mitocondrii există pe lîngă GOT mitocondrială şi o GOT citoplasmatică. Repartizarea activităţii celor două enzime GOT şi GPT pe fracţiuni diferite la creier şi ficat, arată că prin transaminaze nu se poate verifica presupunerea iniţială că fondul proteic comun al proteinelor solubile ar fi reprezentat de către enzimele structturale trecute în soluţie.

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
Bucureşti

Prezentată la redacţie la 24 octombrie 1961

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ТРАНСАМИНАЗ ПО ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМ ФРАКЦИЯМ РАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

РЕЗЮМЕ

Ввиду того, что в одной из предыдущих работ было показано, что растворимые белки митохондрий мозга и печени обладают общим белковым содержанием, в настоящей работе исследуется возможность наличия энзиматически активных белков в указанных

растворимых белках, а также не являются ли они вспомогательными энзимами, лабильно связанными с белковым скелетом митохондрий. Авторы провели сравнительное исследование распределения щавелевоуксусной (GOT) и пировиноградной (GPT) трансаминаз по электрофоретическим фракциям растворимых белков митохондрий мозга и печени крысы. Полученные данные показывают, что первая из указанных трансаминаз распределяется по двум последовательным фракциям в случае обоих органов и что ее максимальная активность соответствует различным фракциям (фракция 2 в случае мозга и фракция 1 — в случае печени). Пировиноградная трансаминаза также распределяется по различным фракциям в обоих органах (фракция 1 в случае мозга и фракция 2 — в случае печени). Таким образом, выдвинутую авторами гипотезу не удалось проверить этим путем.

LA RÉPARTITION DES TRANSAMINASES SUIVANT LES FRACTIONS ÉLECTROPHORÉTIQUES DES PROTÉINES SOLUBLES CONTENUES PAR LES MITOCHONDRIES DU CERVEAU ET DU FOIE DE RAT

RÉSUMÉ

Dans un travail antérieur, les auteurs ont montré que les protéines solubles des mitochondries provenant du cerveau et du foie ont un fond protéique commun. Dans le présent travail ils ont cherché à établir si ce fond commun pourrait être représenté par des protéines actives au point de vue enzymatique, et éventuellement par des enzymes auxiliaires se rattachant par une liaison labile au squelette protéique des mitochondries.

Les auteurs ont fait une étude comparée de la répartition des transaminases oxalo-acétique (GOT) et pyruvique (GPT), sur les fractions électrophorétiques des protéines solubles des mitochondries du cerveau et du foie de rat. Les résultats obtenus montrent que la GOT est répartie dans deux fractions successives des deux organes; cependant leur maximum d'activité correspond à des fractions différentes (la fraction 2, pour le cerveau et la fraction 1′, pour le foie). La GPT a également une répartition différente dans les deux organes (la fraction 1, pour le cerveau et la fraction 2′, pour le foie). Aussi l'hypothèse suggérée par les auteurs n'a pu être vérifiée par cette voie.

BIBLIOGRAFIE

1. D. E. GREEN, *Structure and function of subcellular particles.* Plenary Lecture at the V-th International Congress of Biochemistry, Moscova, 1961.
2. C. ȘELARIU, S. MIHĂESCU, *Cercetarea electroforetică a proteinelor solubile din mitocondriile de creier și ficat de șobolan.* Studii și cercet. de biochimie, *4*, *3*, 349 (1961).

3. Р. Б. ХЕСИН, *Биохимия цитоплазмы*. Издательство Академии Наук СССР, Москва, 1960.
4. S. M. IDU, L. COCIUMIAN, *Metodă simplificată pentru determinarea transaminazei glutamice oxalacetice*. Med. internă, **XI**, *5*, 783 (1959).
5. S. M. IDU, L. COCIUMIAN, *Considerații asupra transaminazelor serice și a valorii determinării lor*. Med. internă, **XII** , *8*, 1257 (1960).
6. N. E. TONHAZI, N. C. WHITE, W. W. UMBREIT, *A rapid method for the estimation of the glutamic-aspartic transaminase in tissues and its application to radiation sickness*. Arch. Biochem., **28**, *1*, 36 (1950).
7. G. A. FLEISCHER, C. S. POTTER, K. G. WAKIM, *Separation of two glutamic-oxalacetic transaminases by paper electrophoresis*. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., **103**, 229 (1960).
8. J. W. BOYD, *The intracellular distribution, latency and electrophoretic mobility of L-glutamate-oxaloacetate transaminase from rat liver*. Biochem. J., **81**, 434 (1961).

OXIDAREA UNOR AMINOACIZI ÎN PREZENȚA SISTEMULUI POLIFENOLOXIDAZIC DIN PLANTE

DE

ODETTE ZAHARIA

Într-o lucrare anterioară [1] am arătat că în frunzele de floarea-soarelui oxidarea glicocolului are loc prin intermediul sistemului polifenoloxidazic, așa cum au arătat W. O. James, E. A. Roberts, H. Beevers, P. C. de Kock [2] în cazul *Atropei Belladona*. Totodată, am constatat că adaosul de prolină intensifică apreciabil oxidarea și dezaminarea glicocolului, manifestîndu-se astfel o interacțiune între acești aminoacizi.

Cum cercetarea interacțiunii dintre aminoacizi ar prezenta interes pentru lămurirea anumitor mecanisme legate de biochimismul acestor compuși, ne-am propus să urmărim acțiunea sistemului polifenoloxidazic din frunzele de floarea-soarelui asupra unui număr mai mare de aminoacizi, precum și influența prolinei asupra oxidării și dezaminării acestora. Am folosit un extract de frunze de floarea-soarelui, soiul Jdanov, iar dintre aminoacizi: alanina, serina, leucina, fenilalanina, acidul glutamic și arginina.

Extractul enzimatic a fost obținut în condițiile descrise anterior [1]. Oxidarea aminoacizilor cercetați s-a urmărit prin consumul de oxigen la aparatul Warburg, într-un sistem ce consta din: 0,1 ml extract, 0,7 ml tampon fosfați (pH 7,8), 0,2 ml pirocatechină 0,05 M, 0,5 ml aminoacizi 0,1 M și apă distilată pînă la completarea volumului de 2 ml. În sistemul martor, volumul soluției de aminoacizi a fost înlocuit cu un volum egal de apă distilată. Cînd s-a urmărit acțiunea prolinei asupra oxidării aminoacizilor, s-a adăugat în sistem 0,5 ml prolină 0,1 M și apoi s-a completat volumul cu apă distilată pînă la 2 ml. Amoniacul eliberat s-a determinat după 90 min, prin metoda Parnas-Wagner.

Din tabela 1 se constată că, spre deosebire de glicocol, deși s-a format complexul colorat între pirocatechina oxidată și aminoacizii cercetați, aceștia nu s-au oxidat. Apariția complexului s-ar putea datora

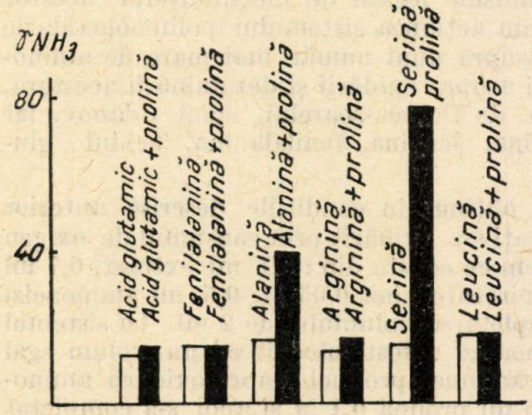
unei reacții de apărare. D. I. Arnon [3] arată că chinona formată este un oxidant puternic pentru țesutul viu, iar după A. V. Szent-Györgyi

Tabela 1

Consumul de oxigen (µl O_2) în sisteme ce conțin diferiți aminoacizi față de sistemul martor (fără aminoacizi), în prezența polifenoloxidazei din extractele frunzelor de floarea-soarelui, soiul Jdanov. Cifrele reprezintă media a 5 — 8 determinări

Sistemul	Valori extreme	Media aritmetică	Diferența	DL pentru P = 0,05
Fără aminoacid	97,3—110,0	103,2	—	—
Acid glutamic	89,9—111,6	98,9	4,3	14,9
Fără aminoacid	84,2—109,9	94,7	—	—
Fenilalanină	80,5—142,1	103,4	8,7	8,9
Fără aminoacid	74,7— 98,4	85,6	—	—
Alanină	72,3—107,3	56,2	0,6	nu a fost cazul să se aplice calculul statistic
Fără aminoacid	83,8—128,1	95,9	—	—
Leucină	94,2—110,9	100,6	4,7	15,2
Fără aminoacid	68,8— 93,5	78,9	—	—
Serină	87,7—105,8	95,2	16,3	18,8
Fără aminoacid	106,0—139,4	124,9	—	—
Arginină	127,9—138,2	130,1	5,2	24,3

(citat după [3]) chinona reacționează cu aminoacizii și proteinele dînd substanțe colorate asemănătoare melaninelor, ceea ce duce la blocarea acțiunii dăunătoare a chinonei. Astfel, în cazul nostru, reacția ar merge numai pînă la formarea complexului, iar acesta nereacționînd mai departe cu aminoacizii cercetați, oxidarea lor nu se mai produce. Numai cu cisteina nu s-a format complexul colorat, aceasta fiind un inhibitor al polifenoloxidazei [4].



Influența prolinei asupra dezaminării unor aminoacizi (γ NH_3) în prezența polifenoloxidazei din frunze de floarea-soarelui, soiul Jdanov.

În tabela 2 și figura 1 sînt prezentate datele privind oxidarea, respectiv dezaminarea aminoacizilor în prezența prolinei.

Se constată că numai în sistemele în care serina, respectiv alanina sînt în prezența prolinei, consumul de oxigen și cantitatea de amoniac eliberat cresc, în toate celelalte cazuri adaosul de prolină neavînd nici o acțiune.

Tabela 2

Influența prolinei asupra oxidării unor aminoacizi (µl O_2) în prezența polifenoloxidazei din frunze de floarea-soarelui, soiul Jdanov. Cifrele reprezintă media a 4—8 determinări

Sistemul	Valori extreme	Media aritmetică	Diferența	DL
Acid glutamic	38,0— 47,0	44,1	—	—
Acid glutamic+prolină	42,5— 51,9	45,1	1,0	nu a fost cazul să se aplice calculul statistic
Fenilalanină	67,7— 79,9	71,9	—	—
Fenilalanină+prolină	63,2— 67,9	65,2	6,7	11,9 (P= 0,05)
Alanină	72,3—107,3	86,2	—	—
Alanină + prolină	90,2—128,3	105,1	18,9*	14,5 (P=0,05)
Arginină	93,3—131,0	114,5	—	—
Arginină + prolină	111,2—146,2	120,2	5,7	15,6 (P=0,05)
Serină	87,7—105,8	95,2	—	—
Serină + prolină	129,1—182,0	154,3	59,1***	35,8 (P=0,001)
Leucină	94,2—110,9	100,6	—	—
Leucină + prolină	106,9—117,4	111,5	10,9	15,2 (P=0,05)

Pentru a verifica dacă fenomenul este oarecum general, am controlat comportarea glicocolului, serinei, alaninei și în prezența sistemului polifenoloxidazic din frunzele de tomate, respectiv de vinete. Extractul enzimatic din frunze de tomate, soiul Budionovka, și de vinete Bucureștene a fost obținut în condițiile descrise anterior. Și în aceste cazuri se constată că numai glicocolul se oxidează intens și că această oxidare se accentuează în prezența prolinei. De asemenea, apare un consum de oxigen și în sistemele ce cuprind alanina, respectiv serina, alături de prolină (tabela 3). În toate cazurile creșterea consumului de oxigen a fost însoțită de apariția amoniacului.

Rezultă că, în condițiile menționate, numai glicocolul se oxidează intens în prezența sistemului polifenoloxidazic din frunze, precum și că în cazul perechilor de aminoacizi: glicocol-prolină, alanină-prolină, serină-prolină are loc o creștere (prima pereche) respectiv apariție (ultimele două perechi) a consumului de oxigen, fenomen care nu s-a observat cînd prolina a fost alături de alți aminoacizi.

Față de aceste constatări, am considerat util să observăm comportarea și altor perechi de aminoacizi. Deoarece dintre cei cercetați numai glicocolul s-a oxidat intens în prezența sistemului polifenoloxidazic, am urmărit în primul rînd comportarea lui alături de aminoacizii de mai sus. Reacția a avut loc într-un sistem similar celui menționat la începutul lucrării, martorul cuprinzînd glicocol (0,5 ml soluție 0,1 M), iar celălalt sistem, pe lîngă glicocol, și aminoacidul cercetat.

Din tabela 4 se constată în toate cazurile o inhibare accentuată a oxidării și dezaminării glicocolului. Cu alte perechi de aminoacizi, ca de exemplu acid glutamic-alanină, alanină-fenilalanină, tirozină-alanină, triptofan-alanină nu s-a constatat nici o oxidare.

Tabela 3

Consumul de oxigen ($\mu l\ O_2$) şi eliberarea de amoniac ($\gamma\ NH_3$) în cazul glicocolului, alaninei şi serinei ca atare, precum şi în urma adaosului de prolină în prezenţa polifenoloxidazei din extractele frunzelor de tomate Budionovka şi vinete Bucureştene. Cifrele reprezintă media a 5—6 determinări

Frunze	Sistemul	Valori extreme		Media aritmetică		Diferenţa		DL	
		$\mu l\ O_2$	$\gamma\ NH_3$	$\mu l\ O_2$	γNH_3	$\mu l\ O_2$	γNH_3	μlO_2	$\gamma\ NH_3$
Tomate	Fără aminoacid	2,8— 4,6	7— 9	3,5	7,7	—	—	—	—
	Glicocol	34,9—49,9	56—73	42,3	62,0	38,8***	54,3***	38,8 (P=0,001)	3,2 (P=0,001)
	Glicocol + prolină	55,7—71,9	71—87	64,1	76,2	21,8*	14,2***	21,0 (P=0,05)	10,1 (P=0,001)
	Serină	12,2—24,8	21—32	16,8	25,8	—	—	—	—
	Serină + prolină	30,7—40,4	67—68	34,4	67,3	17,6**	41,5***	13,8 (P=0,01)	23,6 (P=0,001)
	Alanină	21,7—28,5	22—23	25,5	22,1	—	—	—	—
	Alanină + prolină	33,4—51,8	44—57	41,3	46,2	15,8*	24,1***	13,6 (P=0,05)	19,2 (P=0,001)
Vinete	Fără aminoacid	16,9— 20,5	13	18,4	13	—	—	—	—
	Glicocol	95,1—110,6	106—109	97,2	107,6	78,8***	94,6***	32,9 (P=0,001)	19,7 (P=0,001)
	Glicocol + prolină	119,9—147,7	159—187	136,2	173	39,0***	65,3***	27,9 (P=0,001)	19,7 (P=0,001)
	Serină	48,9— 53,6	71— 76	51,5	72	—	—	—	—
	Serină + prolină	68,3— 82,8	119—126	71,2	122	19,7**	50***	17,4 (P=0,01)	11,9 (P=0,001)
	Alanină	43,2— 47,2	68— 70	45,9	68,7	—	—	—	—
	Alanină + prolină	58,9— 68,8	79— 83	64,7	81,5	18,8**	12,8***	15,3 (P=0,01)	5,9 (P=0,001)

Tabela 4

Influența diferiților aminoacizi asupra oxidării (μl O_2) și dezaminării (γ NH_3) glicocolului în prezența polifenoloxidazei din frunzele de floarea-soarelui, soiul Jdanov. Cifrele reprezintă media a 5—9 determinări

Sistemul	μl O_2				γ NH_3			
	Valori extreme	Media aritmetică	Diferența	DL pentru P=0,001	Valori extreme	Media aritmetică	Diferența	DL
Glicocol	228,9—257,5	243,5	—	—	112—140	127,6	—	—
Glicocol + acid glutamic	145,8—212,5	169,5	74,0***	40,9	107—129	118,3	9,3	32,1 (P=0,05)
Glicocol	170,1—208,3	189,2	—	—	112—140	127,7	—	—
Glicocol + fenilalanină	104,5—151,2	129,3	59,9***	15,9	60— 78	68	59,7***	23,4 (P=0,001)
Glicocol	192,2—229,6	212,0	—	—	193—207	202,2	—	—
Glicocol + serină	142,1—169,6	151,7	60,3***	20,3	153—200	171,9	30,3***	17,8 (P=0,001)
Glicocol	192,2—229,6	212,0	—	—	136—190	159,5	—	—
Glicocol + arginină	126,6—172,2	155,4	56,6***	21,7	91—132	106,6	52,9*	34,5 (P=0,05)
Glicocol	219,8—283,7	248,0	—	—	170—207	181,5	—	—
Glicocol + leucină	195,3—243,6	217,2	30,8***	13,3	170—190	189,3	7,7	33,3 (P=0,05)

Faptul că în condițiile arătate s-a pus în evidență pe de o parte o oxidare proprie a glicocolului, care este mult accentuată de prezența prolinei, iar pe de altă parte o inhibare accentuată a acestei oxidări cînd glicocolul este însoțit de un alt aminoacid, ne face să presupunem că glicocolul ar avea o poziție specială între aminoacizi, ceea ce îi conferă probabil un rol deosebit în metabolismul plantei. Așa de exemplu, S. Weinhouse [5] și W. D. Loomis și P. K. Stumpf [6] arată că glicocolul este un aminoacid foarte activ, solicitat într-un număr mare de reacții, cercetările din ultimii ani confirmînd rolul important al glicocolului în plante. A. Weissbach și B. L. Horecker [7] menționează că glicocolul și acidul glicolic sînt formați în fazele inițiale ale fotosintezei. I. Zelitch și S. Ochoa [8], I. Zelitch [9], N. E. Tolbert și M. S. Cohan [10] pun în evidență prezența oxidazei acidului glicolic și a reductazei acidului glioxilic în plantele verzi și dovedesc transformarea enzimatică a acidului glicolic în acid glioxilic și a acestuia în glicocol. Mai mult, H. I. Nakado și S. Weinhouse [11] arată posibilitatea transformării acidului glioxilic în glicocol chiar pe cale neenzimatică.

Existînd deci posibilitatea de a se forma în cantitate mare prin procesul de fotosinteză și avînd o reactivitate accentuată, glicocolul se manifestă ca un aminoacid deosebit.

În ceea ce privește inhibarea oxidării sale de către ceilalți aminoacizi, deoarece aceștia au fost deosebiți structural, nu credem că ar fi o inhibiție competitivă. Pentru moment însă nu avem date suficiente pentru explicarea acestui mecanism.

Pentru explicarea celuilalt aspect al observațiilor noastre, și anume comportarea asemănătoare a glicocolului, alaninei și serinei în prezența prolinei, ar trebui luate în considerare datele din literatură care dovedesc pe de o parte că acești aminoacizi derivă din compuși cu carbon foarte apropiați și că atît precursorii lor cît și aminoacizii respectivi apar în fazele inițiale ale fotosintezei, iar pe de altă parte posibilitatea de interconvertibilitate a acestor aminoacizi. Așa de exemplu, R. W. Newburgh și R. H. Burris [12], infiltrînd acid piruvic-2-C^{14} în frunze de tutun, găsesc C^{14} în alanină și în glicocol. W. B. Mc Conwell și E. Bilinski [13], injectînd formiat C^{14} și glicocol-1-C^{14} în tulpini de grîu, constată apariția de serină, iar A. H. W. Hanschild [14] evidențiază apariția serinei într-un extract din frunze de *Zea mays* la care s-a adăugat glicocol. N. E. Tolbert și M. S. Cohan [10] dovedesc la plante de orz și grîu, atît *in vitro* prin incubare, cît și *in vivo* prin stropire și infiltrare cu acid glicolic, apariția glicocolului și a serinei. L. P. Vernon și S. Aronoff [15] observă că prin tratarea frunzelor de soia cu $C^{14}O_2$ în condiții de fotosinteză, primii aminoacizi marcați sînt glicocolul, alanina și serina.

Deci, pe de o parte formarea în fazele inițiale ale fotosintezei a precursorilor imediați ai glicocolului, alaninei și serinei, iar pe de altă parte posibilitatea de interconvertibilitate a acestora sînt indicații că ar exista o legătură între constatările din lucrarea de față și procesul de fotosinteză.

Tabela 5

Oxidarea glicocolului, alaninei şi serinei ca atare (A) precum şi în prezenţa prolinei (B) în sisteme ce conţin polifenoloxidaza din seminţe şi rădăcini de floarea-soarelui, soiul Jdanov. Cifrele reprezintă media a 4—9 determinări

	Sistemul	Seminţe				Rădăcini			
		Valori extreme	Media aritmetică	Diferenţa	DL pentru P=0,05	Valori extreme	Media aritmetică	Diferenţa	DL pentru P=0,05
A	Fără aminoacid	54,4— 78,7	63,2	—	—	143,0—157,5	152,3	—	—
	Glicocol	55,6— 85,1	70,1	6,9	13,3	148,3—156,4	154,4	2,1	40,6
	Fără aminoacid	54,4— 65,2	60,1	—	—	85,6—103,3	88,3	—	—
	Alanină	54,6— 65,2	59,8	0,3	6,1	70,0—104,4	86,5	1,8	14,3
	Fără aminoacid	58,1— 65,2	61,1	—	—	71,2— 88,6	78,2	—	—
	Serină	53,7— 60,2	57,9	3,2	4,1	72,9— 86,9	80,7	2,5	9,9
B	Glicocol	81,6—120,9	102,6	—	—	148,3—156,4	151,1	—	—
	Glicocol + prolină	93,4—107,6	100,7	1,9	16,5	181,7—214,7	200,0	48,9*	40,6
	Alanină	24,6— 29,9	26,9	—	—	70,0—104,4	86,5	—	—
	Alanină + prolină	19,5— 31,1	25,7	1,2	6,7	78,1— 98,6	90,0	3,5	14,3
	Serină	43,1— 59,8	53,2	—	—	50,3— 65,6	56,7	—	—
	Serină + prolină	43,1— 59,6	54,8	1,6	12,5	53,0— 69,5	58,1	1,4	9,6

Am considerat că o verificare imediată a acestei ipoteze ar fi cercetarea comportării acestor aminoacizi în prezența sistemului polifenoloxidazic din părți sau organe ale plantei care în mod obișnuit nu fac fotosinteză.

Pentru aceste experiențe am ales rădăcinile și semințele de floarea-soarelui, după ce în prealabil am verificat prin metoda D. M. Mihlin și Z. S. Bronovițkaia, indicată de A. I. Ermakov și colaboratori [16], dacă în extractele respective există activitate polifenoloxidazică.

Concentrația extractelor folosite a fost aceeași ca în cazul frunzelor. Activitatea polifenoloxidazică a semințelor fiind însă mai slabă, în sistem s-au pus 0,2 ml extract în loc de 0,1 ml, iar timpul de reacție s-a mărit la 180 min. S-au urmărit consumul de oxigen, respectiv eliminarea de amoniac, în sisteme ce conțineau glicocol, respectiv alanină sau serină ca atare, precum și în prezența prolinei. Din datele tabelei 5 se constată că în extractele din semințe nu se evidențiază consum de oxigen nici cînd aminoacizii respectivi sînt singuri în sistem, nici cînd sînt împreună cu prolina. În extractele din rădăcini (tabela 5), numai în sistemul ce cuprinde glicocol alături de prolină s-a constatat consum de oxigen și apariție de amoniac. Faptul că nici în rădăcini, unde legătura cu partea aeriană a plantei ce face fotosinteza este directă, nu s-a evidențiat oxidarea glicocolului ca atare — oxidare care este puternică la frunze — ci numai în prezența prolinei, ni se pare semnificativ. Aceste date ar pleda deci în favoarea ipotezei că ar exista o legătură între procesul de fotosinteză și comportarea glicocolului, alaninei și serinei, ceea ce desigur conferă acestor aminoacizi anumite calități și un rol deosebit în metabolismul plantelor.

În concluzie, din cele de mai sus rezultă că oxidarea secundară a aminoacizilor în prezența sistemului polifenoloxidazic din frunze nu reprezintă un mecanism general de oxidare a aminoacizilor din plante și că comportarea glicocolului, alaninei și serinei ar fi legată de procesul de fotosinteză.

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
București

Prezentată la redacție la 16 octombrie 1961

ОКИСЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ В ПРИСУТСТВИИ ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ

РЕЗЮМЕ

Автор определял потребление кислорода при помощи аппарата Варбурга и выделение аммиака методом Парнас-Вагнера и установил, что в отличие от гликокола, глутаминовая кислота, аланин, серин, аргинин, фенилаланин и лейцин не окисляются в присутствии поли-

фенолоксидазной системы листьев подсолнуха, томатов и баклажан. Только в случае пар гликокол-пролин, аланин-пролин и серин-пролин имеет место потребление кислорода и выделение аммиака. Было также установлено, что исследованные аминокислоты тормозят окисление и дезаминирование гликокола.

Не было констатировано потребления кислорода листьями ни в случае, когда гликокол, аланин, серин находились одни в системе, ни в случае, когда они находились в присутствии пролина.

В корнях, только для системы, состоящей из гликокола и пролина, было констатировано потребление кислорода и выделение аммиака.

Вторичное окисление аминокислот в присутствии полифенолоксидазной системы листьев не представляет общий механизм окисления аминокислот растений, а схожее поведение гликокола, аланина и серина может быть связано с процессом фотосинтеза.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКА

Влияние пролина на дезаминирование некоторых аминокислот (γNH_3) в присутствии полифенолоксидазы растений подсолнуха, сорта Жданов.

L'OXYDATION DE CERTAINS ACIDES AMINÉS EN PRÉSENCE DU SYSTÈME POLYPHÉNOLOXYDASIQUE DES PLANTES

RÉSUMÉ

En mesurant la consommation d'oxygène au moyen de l'appareil de Warburg et la libération d'ammoniaque, par la méthode de Parnas-Wagner, l'auteur a constaté que, contrairement au glycocolle, les acides aminés suivants : acide glutamique, alanine, sérine, arginine, phenylalanine et leucine, ne sont pas oxydés en présence du système polyphénoloxydasique contenu dans les feuilles d'hélianthe, de tomate et d'aubergine. Ce n'est que dans les cas où des couples tels que glycocolle-proline, alanine-proline et sérine-proline sont présents, qu'à lieu la consommation d'oxygène et la libération d'ammoniaque. A part cela, les acides aminés étudiés inhibent l'oxydation et la désamination du glycocolle.

Dans les semences, on n'a pu mettre en évidence une consommation d'oxygène, ni lorsque le glycocolle, l'alanine ou la sérine ont figuré seuls dans le système, ni quand ils se sont trouvés en présence de la proline.

Dans les racines, ce n'est que pour le système qui comprend le glycocolle à côté de la proline qu'on a constaté une consommation d'oxygène et l'apparition d'ammoniaque.

Il résulte que l'oxydation secondaire des acides aminés, en présence du système polyphénoloxydasique des feuilles, ne représente pas un mé-

canisme général d'oxydation des acides aminés des plantes et que le comportement similaire du glycocolle, de l'alanine et de la sérine serait en rapport avec le processus de photosynthèse.

EXPLICATION DES FIGURES

L'influence de la proline sur la désamination de certains acides aminés (γ NH_3) en présence de la polyphénoloxydase des feuilles d'hélianthe, variété Jdanov.

BIBLIOGRAFIE

1. O. ZAHARIA, *Accelerarea oxidării glicocolului prin sistemul polifenoloxidazic din floarea-soarelui în prezența prolinei.* Studii şi cercet. biochimie, *2*, 235 (1961).
2. W. O. JAMES, E. A. ROBERTS, H. BEEVERS, P. C. DE KOCK, *The secondary oxidation of aminoacids by the catecholoxidase of Belladona.* Biochem. J., **43**, 626 (1948).
3. D. I. ARNON, *Functional aspects of copper in plants. A symposium on copper metabolism.* Ed. by W. D. McElroy a. B. Glass Baltimore, 1950, 103.
4. J. B. SUMNER, G. F. SOMERS, *Chemistry and methods of enzymes.* N. Y., 1953, 242.
5. S. WEINHOUSE, *The synthesis and degradation of glycine. A symposium on aminoacid metabolism.* Ed. by W. D. McElroy a. B. Glass, Baltimore, 1955, 637.
6. W. D. LOOMIS, P. K. STUMPF, *The special role of individual aminoacids in plant metabolism. Handbuch der Pflanzenphysiologie.* Springer Verlag, Berlin, 1958, **8**, 265.
7. A. WEISSBACH, B. L. HORECKER, *The formation of glycine from ribose-5-phosphate. A symposium on aminoacid metabolism.* Ed. by W. D. McElroy a. B. Glass, Baltimore, 1955, 741.
8. I. ZELITCH, S. OCHOA, *Oxidation and reduction of glycolic and glyoxilic acids in plants. I. Glycolic acid oxidase.* J. Biol. Chem., **201**, 707 (1953).
9. I. ZELITCH, *Oxidation and reduction of glycolic and glyoxilic acids in plants. II. Glyoxilic acid reductase.* J. Biol. Chem., **201**, 719 (1953).
10. N. E. TOLBERT, M. S. COHAN, *Products Formed from glycolic acid in plants.* J. Biol. Chem., **204**, 649 (1953).
11. H. I. NAKADO, S. WEINHOUSE, *Non enzymatic transamination with glyoxilic acid and various aminoacids.* J. Biol. Chem., **204**, 831 (1953).
12. R. W. NEWBURGH, R. H. BURRIS, *Effect of inhibition on the photosynthetic fixation of carbon dioxide.* Arch. of. bioch. and biophis, **49**, 98 (1954).
13. W. B. MC. CONWELL, E. BILINSKI, *Studies on wheat plants using carbon-14-compounds. IX. Radioactivity of wheat following injection of formate-C^{14} and glycine-1-C^{14} with special reference to serine labelling.* Canadian Journ. of biochem. and physiol., **37**, *4*, 549 (1959).
14. A. H. W. HANSCHILD, *The interconversion of glycine and serine in Zea Mays.* Canadian Journ. of biochem. and physiol, **37**, 7, 887 (1959).
15. L. P. VERNON, S. ARONOFF, *Metabolism of soybean leaves. II. Aminoacids formed during short-term photosynthesis.* Arch. Biochem., **29**, 179, (1950),
16. Л. Н. ЕРМАКОВ, В. В. АРАСИМОВИЧ, М. Н. СМИРНОВА-ИКОННИКОВА, Н. К МУРРИ, Методы биохимического исследования растений. Москва, Сельхозгиз, 1952, 65.

NOTĂ DE LABORATOR

PROCEDEU PENTRU MĂSURAREA ENDOSMOZEI IODULUI ÎN COLUL UTERIN

DE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI, A. MIHĂESCU şi A. POPESCU

Metodele curente pentru diagnosticul cancerului colului uterin se bazează în special pe colposcopie şi biopsie. Au fost propuse şi unele metode biochimice, cum sînt cele bazate pe aşa-numitul test glucuronidazic [1], [2], pe urmărirea metabolismului celular prin determinări manometrice ale glicolizei anaerobe [3] şi altele. Aceste metode necesită însă, ca şi biopsia, preluarea unor porţiuni de ţesut. Se mai poate menţiona şi metoda histochimică a lui G. Gomori (citat după [4]), bazată pe determinarea activităţii fosfatazelor, respectiv fosfamidazei intracelulare, dar şi această metodă necesită preluări de ţesut.

În afara metodelor amintite, se mai cunosc diferite teste, dintre care menţionăm testul cu iod al lui W. Schiller [5], [6], elaborat în 1924. Testul acesta constă în tamponarea colului cu o soluţie de lugol: se constată că epiteliul colului normal se colorează în brun închis, pe cînd epiteliul colului canceros nu prezintă această coloraţie. S-a dovedit că culoarea brună se datoreşte prezenţei unei cantităţi apreciabile de glicogen, care dă cu iodul coloraţia caracteristică menţionată, şi că glicogenul dispare în cursul procesului de cancerizare. Deşi părea promiţător, testul cu iod al lui W. Schiller s-a dovedit a nu fi specific. Totuşi se recunoaşte că acest test poate aduce precizări utile în diagnosticul precoce al cancerului uterin, constituind totodată o completare a examenului colposcopic [3].

Dat fiind că testul cu iod al lui W. Schiller dovedeşte că iodul pătrunde cu multă uşurinţă în ţesutul epitelial al colului uterin, ne-am gîndit dacă nu cumva, măsurînd viteza de pătrundere a iodului în acest epiteliu, s-ar putea ajunge la o metodă mai precisă şi mai obiectivă pentru caracterizarea stării funcţionale a colului uterin decît simpla observare a coloraţiei datorite interacţiunii dintre iod şi glicogen. Această presupunere ni s-a părut cu atît mai justificată, cu cît se ştie că permea-

bilitatea țesuturilor canceroase pentru diferite substanțe se deosebește de permeabilitatea țesuturilor normale corespunzătoare. De altfel, cercetările privind viteza exosmozei electroliților din piele ne-au permis să elaborăm o metodă conductometrică pentru caracterizarea stării funcționale a pielii în diferite cazuri patologice [7], [8].

Pentru urmărirea pătrunderii iodului în colul uterin trebuiau luate în considerație următoarele: cantitatea de substanță care trece dintr-o soluție în țesut depinde nu numai de permeabilitatea țesutului pentru acea substanță, dar și de suprafața de contact dintre soluție și țesut, de concentrația substanței în soluție, precum și de timp. Cu cît suprafața de contact este mai mare, cu cît concentrația substanței în soluție este mai mare și cu cît timpul de contact dintre soluție și țesut este mai îndelungat, cu atît mai multă substanță va trece din soluție în țesut. Trecerea substanței din soluție în țesut face ca concentrația substanței în soluție să scadă, iar această scădere este cu atît mai însemnată cu cît cantitatea de soluție este mai mică. Prin urmare, trebuiau stabilite printr-o serie de încercări prealabile condițiile experimentale în așa fel încît raporturile dintre toate variabilele menționate să permită urmărirea analitică cantitativă a pătrunderii iodului din soluție în col.

Fără a ne opri asupra detaliilor cercetărilor preliminare, precizăm că am stabilit următoarele condiții de lucru: pe colul uterin se aplică un tub de sticlă cu diametrul de 3 cm și lung de 20 cm. În acest tub se introduc 20 ml soluție apoasă de iod 0,005 n, obținută prin diluarea corespunzătoare a unei soluții de iod 0,05 n, preparată din 6,35 g iod și 32 g iodură de potasiu la litru. Soluția se lasă în contact cu colul timp de 10 min, apoi se iau 2—3 probe de cîte 5 ml și se titrează cu tiosulfat de sodiu 0,005 n în prezență de amidon. Se constată că numărul de ml de tiosulfat folosit pentru titrarea acestor probe este mai mic decît pentru titrarea probelor luate din soluția inițială de iod, 0,005 n, iar această diferență este cu atît mai mare cu cît țesuturile colului uterin sînt mai permeabile pentru iod.

Precizarea acestor condiții de lucru s-a făcut la maternitatea „Polizu" din București, în colaborare cu prof. dr. C. Stanca.

S-a constatat că, în condițiile menționate, cantitatea de iod ce pătrunde în col corespunde la 0,1—2,3 ml soluție de iod 0,005 n. Pe col normal se obțin valori cuprinse între 0,2—0,6 ml, iar valorile ce depășesc pragul de 0,6 ml indică permeabilitatea crescută a țesutului colului uterin în diferite stări patologice.

Cercetările ce se efectuează acum de către prof. dr. C. Stanca, dr. A. Popescu și A. Mihăescu la maternitatea „Filantropia" din București au ca scop stabilirea aplicabilității acestei metode în cazuri de cancer și alte afecțiuni uterine.

Catedra de biochimie,
Facultatea de științe naturale a Universității
„C. I. Parhon" București

Prezentată la redacție la 28 octombrie 1961

BIBLIOGRAFIE

1. W. H. FISHMAN, B. SPRINGER, R. BAUNETTI, J. Biol., Chem., **173**, 449 (1948).
2. L. D. ODELL, J. BURT, R. BETHEA, Science, **109**, 564 (1949).
3. A. LIMBURG, *Die Frühdiagnose des Uteruscarcinoms.* G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1956. p. 272, p. 34.
4. C. MILLER, Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med., **69**, 407 (1948).
5. W. SCHILLER, Wirch. Arch., **263**, 279 (1927).
6. W. SCHILLER, Archiv. Gynäk., **133**, 211 (1928).
7. E. MACOVSCHI, S. COMOROȘAN, Studii și cercet. chimie, **4**, 271 (1956).
8. E. MACOVSCHI, S. COMOROȘAN, Ärztliche Forschung, **12**, *5*, 41 (1958).

NOTĂ DE LABORATOR

DISPOZITIV DE ELECTROFOREZĂ MICROSCOPICĂ PENTRU PARTICULE BIOLOGICE ÎN SUSPENSIE

DE

S. ANTOHI şi MARIA ANTOHI

Printre metodele de studiu ale structurii fizico-chimice de suprafaţă a particulelor biologice (bacterii, leucocite, hematii, levuri, virusuri) s-a dovedit utilă şi electroforeza microscopică [1], [2], [6]. În această metodă cîmpul electric este creat cu ajutorul unei celule care să permită urmărirea directă a particulei aflate sub acţiunea curentului electric. Pînă în prezent s-au imaginat numeroase celule de electroforeză, cele mai cunoscute fiind : celula Abramson, modificată de Northrop şi Kunitz (cit. după [1] şi [6]) ; celula Choucroum Plotz [3], [4] ; celula Smith şi Lisse (cit. după [1]) ; celula Seigneurin [7].

În nota de faţă se va da descrierea unui dispozitiv de electroforeză microscopică deosebit de cele citate [1],[3],[4],[6],[7], cu ajutorul căruia s-au făcut studii asupra fimbriilor bacteriene, leucocitelor, levurilor şi hematiilor ; totodată se va prezenta şi metoda de lucru.

Descrierea dispozitivului (fig. 1). Dispozitivul este format din două tuburi de sticlă Pyrex în U, fiecare din ele avînd lungimea de 8—10 cm şi diametrul interior de 0,4 cm. Între aceste două tuburi se dispune celula propriu-zisă (*3*), formată dintr-o canulă plată, lungă de 1 cm, cu secţiunea dreptunghiulară, avînd înălţimea de 0,03 cm şi baza de 0,3 cm (dimensiunile interioare), suprafaţa secţiunii fiind de $9 \cdot 10^{-3}$ cm^2 ; grosimea pereţilor celulei propriu-zise este de 0,030 cm. Între cele două tuburi în U şi paralel cu celula propriu-zisă se montează o bară de sticlă (*4*), ce dă mai multă soliditate dispozitivului ; celula astfel descrisă se fixează pe o placă de plexiglas (fig. 2), prin intermediul a 2 cleme metalice (*1*) ; placa de plexiglas are un orificiu cu diametrul de 1,5 cm (*2*), care permite trecerea razelor de lumină şi 2 borne (*3*) de care se fixează sîrmele de contact. Celula are patru comunicări cu exteriorul (fig. 1) : *1*, *1'* şi *2*, *2'*. Deschizăturile *1* şi *1'* se astupă cu dopuri de cauciuc tăiate plat (*4*, fig. 2) care pe una din margini au o fosă ce îmbucă etanş deschizăturile. Prin

dopurile de cauciuc trec electrozii (*5*, fig. 2), formați din sîrmă de platină (0,5 mm Ø) sau sîrmă de cupru (1 mm Ø).

Reactivi. Se folosesc următorii reactivi:

Soluția tampon izotonică după Kellenberger [5]: $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ — —7,0 g, NaCl — 4,0 g, KH_2PO_4 — 3,0 g, $MgSO_4$ — 0,2 g, apă bidistilată adus la 1 000 ml; pH 6,7.

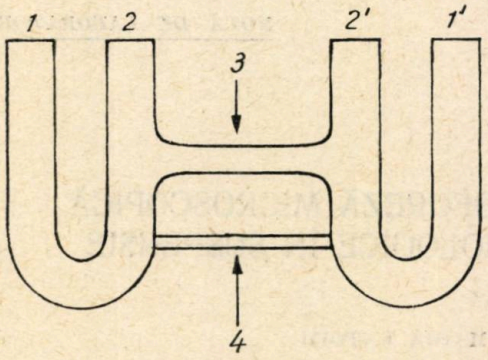


Fig. 1. — Celula de electroforeză.

1,1' — Deschizăturile electrodice; *2,2'* — deschizături pentru introdus suspensia de particule; *3* — celula propriu-zisă; *4* — bară de sticlă.

Soluție de sulfat de cupru — 2%.

Agar 2%, făcut cu tampon Kellenberger.

Sursa de curent cuprinde o baterie de acumulatori ce dă o tensiune totală de 24—30 V. Efectuîndu-se caracteristica volt-amperică a dispozitivului montat în condiții de lucru, s-a constatat că la tensiunile între 0 — 40 V dispozitivul consumă un curent variabil între 0—5 mA; după curba caracteristicii, se constată că între valorile de mai sus ale tensiunii

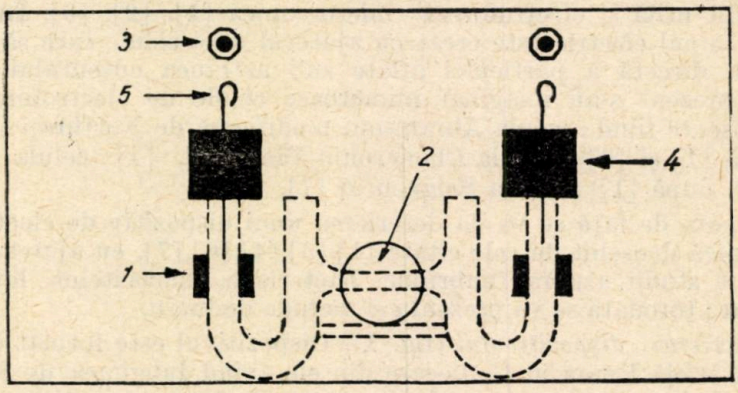


Fig. 2. — Dispozitivul de electroforeză.

1 — Cleme metalice ce fixează celula; *2* — orificiu pentru luminozitate; *3* — borne pentru contact electric; *4* — dopuri de cauciuc plate; *5* — electrozi.

și intensității curentului rezistența este liniară și constantă, avînd 8,14 K Ω. Conexiunile electrice se efectuează cu sîrmă de cupru cu diametrul de 0,5 mm.

Partea optică cuprinde un microscop obișnuit, avînd ocular 15 ×, la care se montează un micrometru ocular tip Zeiss în scară sau rețea; acestea se etalonează față de obiectivul folosit, cu un micrometru obiectiv Zeiss. Între sursa de lumină și microscop se interpune un balon sferic, umplut cu o soluție de sulfat de cupru 5%, pentru a elimina influența căldurii degajate de lampă.

Metoda de lucru. Metoda de lucru cuprinde mai mulți timpi:

1. Se prepară soluțiile menționate mai sus și se corectează pH-ul soluției tampon.

2. Se prepară particulele biologice de studiat. Bacteriile: se utilizează culturi de 24 ore în bulion simplu, care se centrifughează, depozitul reluîndu-se pentru spălare de 1—2 ori în tampon Kellenberger, apoi se suspensionează în tampon. Hematiile: se recoltează sînge pe citrat de sodiu soluție 3,8%, se centrifughează, iar depozitul hematic se spală o dată cu tampon, apoi se suspensionează depozitul 1% în același tampon. Procedeul este același și pentru celulele din culturi tisulare, cît și pentru leucocite.

3. Se introduce agarul tamponat, lichefiat în prealabil la baie de apă, prin deschizăturile *1* și *1'*, pînă cînd nivelul gelozei se ridică în tuburile în formă de U pînă la marginea superioară a barei transversale; celula se ține apoi vertical, cu deschizăturile în sus, pînă cînd se solidifică agarul.

4. Compartimentele *1* și *1'*, astfel create, se umplu cu sulfat de cupru 2%, apoi se montează electrozii, avînd grijă să se scoată aerul, prin tracțiuni efectuate pe dopul de cauciuc în așa fel ca geloza să nu se deplaseze prea mult.

5. Prin una din deschizăturile *2* sau *2'* se introduce cu pipeta Pasteur suspensia de particule preparată anterior, avînd grijă să nu se formeze bule de aer în interiorul celulei propriu-zise (*3*, fig. 1) sau a comparatimentului *2*, *2'*; compartimentul se umple incomplet, lăsîndu-se cîte un spațiu gol de 1 mm înălțime la nivelul deschizăturilor; în aceste spații se pun cîte 1—2 picături de parafină solidă, lichefiată la cald; aceasta se solidifică în 1—2 min.

6. Se fixează celula pe placa de plexiglas și aceasta pe platina microscopului, se potrivește imaginea ca pentru preparat proaspăt, între lamă și lamelă; prin mișcările vizei micrometrice se caută cîmpul în care particulele sînt animate de mișcări browniene sau de propriile lor mișcări (cînd sînt mobile).

7. O dată cîmpul găsit, se face conexiunea electrozilor în circuitul electric, întregul conținut al celulei transformîndu-se astfel într-un cîmp electric.

8. Se cronometrează viteza de migrare a particulelor pe o anumită distanță, avînd, în prealabil orientată scara micrometrului în sensul migrării. Pentru măsurarea timpului se folosește un cronometru obișnuit, care să aibă diviziuni de maximum 1/5 secunde. Pe o distanță fixată anterior pe scara micrometrului, se cronometrează de 10 ori cîte o particulă de fiecare dată și apoi se calculează media, care va fi introdusă în formula de mai jos.

9. Se deconectează celula, se scot electrozii, se desfac dopurile de parafină, apoi se spală cu amestec sulfocromic obișnuit și se lasă 5 min în acest amestec; dopurile de geloză se scot prin suflare bruscă în deschizăturile *1* și *1'*, prin intermediul unui tub de cauciuc ce se montează ad-hoc. Se spală celula la jet de apă de 3—4 ori și se golește de apă cu ajutorul unei trompe de vid; apoi se spală cu alcool și la sfîrșit cu acetonă.

10. Viteza de migrare, conform datelor internaţionale, se exprimă în microni/s/V/cm, pentru calcule folosindu-se formula :

$$V = \frac{D}{T.\ \text{V/cm}},$$

în care :

D = distanţa parcursă de particulă în microni,
T = timpul de migrare în secunde,
V/cm = numărul de volţi pe cm de cîmp electric, măsurat de la vîrfurile electrozilor,
V = viteza de migrare în microni/s/V/cm.

Pentru fiecare determinare timpii se reiau de la început ; cu celula de faţă se pot face patru determinări la oră.

Rezultatele obţinute cu dispozitivul de electroforeză descris mai sus, după mai multe determinări, sînt superpozabile datelor din literatură.

Institutul „Dr. I. Cantacuzino", Bucureşti

Prezentată la redacţie la 10 iulie 1961

BIBLIOGRAFIE

1. BIER M., *Electrophoresis*, Academic Press, New York a. London, 1959.
2. BRINTON C. C., *Nonflagellar appendages of bacteria*, Nature, **183**, 702 (1959).
3. CHOUCROUN N., PLOTZ H., *Différences entre les électrisations de diverses variétés de bacilles tuberculeux*, C. R. Acad. Sci., **199**, 165 (1934).
4. GUILLERMOND A., CHOUCROUN N., *Essai d'électrophorèse à l'intérieur des cellules végétales*, C.R. Acad. Sci., **203**, 225 (1936).
5. KELLENBERGER E., *Symposium on bacterial cytology*, New York a. London, 1953, 45.
6. MACCACARO G. A., TURRY M., *Studii sulle fimbrie batteriche. II Osservazioni microelettroforetiche*, Giorn. Microbiol., **7**, 69 (1959).
7. SEIGNEURIN R., *La conductibilité et l'éléctrophorèse des suspensions microbiennes*, Thèse de Montpellier, 1935.

AL V-LEA CONGRES INTERNAȚIONAL DE BIOCHIMIE

Uniunea Internațională de Biochimie, care reunește Societățile naționale de biochimie ale diferitelor țări, organizează conform statutului său, la intervale de trei ani, congrese internaționale de biochimie.

Între 10—16 august 1961, cu sprijinul Societății de biochimie a U.R.S.S. și sub auspiciile Uniunii Internaționale de Biochimie, a fost organizat la Moscova cel de al V-lea Congres Internațional de Biochimie.

Acest Congres s-a caracterizat printr-o amploare deosebită, fără precedent, fiind considerat în unanimitate ca una din cele mai grandioase manifestări științifice la nivel internațional. Într-adevăr, al V-lea Congres Internațional de Biochimie de la Moscova a depășit cu mult congresele anterioare, atît prin organizarea sa desăvîrșită, cît și prin tematica sa.

La acest Congres, pentru prima dată a participat un număr impresionant de delegați — aproximativ 6 000 din peste 56 de țări, iar numărul comunicărilor și conferințelor prezentate la congres a fost de asemenea impresionant, peste 2 000.

Al V-lea Congres Internațional de Biochimie de la Moscova, a confirmat avîntul și dezvoltarea deosebită pe care le-a luat biochimia contemporană, ca știință fundamentală, independentă, care păstrează desigur raporturile dialectice cu disciplinele științifice conexe. Congresul a subliniat de asemenea rolul important care revine biochimiei și pe care trebuie să-l aibă biochimia în cunoașterea profundă a materiei vii, a substratului biochimic ce stă la baza tuturor manifestărilor ei vitale și a posibilităților de dirijare a proceselor biochimice ale materiei vii. Lucrările Congresului au marcat totodată o etapă importantă în evoluția biochimiei moderne și au deschis largi și noi perspective viitoarelor investigații; a ieșit astfel și mai clar în evidență tendința și necesitatea de a se trece la cercetarea biochimică tot mai aprofundată a structurii și naturii intime a organismului viu în general.

Lucrările celui de al V-lea Congres Internațional de Biochimie de la Moscova s-au desfășurat în impunătorul local al Universității „Lomonosov". Aceste lucrări au fost repartizate în cadrul a 8 simpozioane și 28 de secții. În afară de acestea, la Congres au fost organizate două conferințe plenare : una la deschiderea Congresului, care a avut ca tematică

„Structura și funcțiunile particulelor subcelulare" (D. Green, S.U.A.), și alta la închiderea lucrărilor Congresului, intitulată „Microstructura proteinelor și funcția lor biologică" (F. Sorm, R. S. Cehoslovacă).

Cele mai actuale probleme ale biochimiei au fost prezentate și dezbătute în cadrul celor 8 simpozioane, care au cuprins referate de ansamblu privind cercetările din diferite domenii mari ale biochimiei și care au avut ca tematică : „Structura biologică și funcțiunea la nivel molecular" ; „Biochimia funcțională a structurilor celulare" ; „Biochimia evolutivă" ; „Principiile moleculare de acțiune și inhibiție a enzimelor" ; „Respirația intracelulară : oxidările fosforilante și nefosforilante" ; „Mecanismul fotosintezei" ; „Biosinteza lipidelor" și, în fine, „Bazele biochimice ale tehnologiei industriei alimentare".

De asemenea, în cele 28 secții s-au prezentat numeroase comunicări originale, care au cuprins cele mai variate domenii de cercetare ale biochimiei. Printre acestea, menționăm ca mai importante : probleme legate de biochimia proteinelor și aminoacizilor, de biochimia acizilor nucleici, de biochimia musculară și a sistemului nervos, de evoluția biochimică, de enzimologie, de biochimia plantelor, de biochimia medicală și a microorganismelor, de genetica biochimică, de biochimia virusurilor etc.

Din simpla enumerare a tematicii conferințelor plenare și a simpozioanelor, ca și din conținutul lucrărilor prezentate în secții, reiese și mai evident că trăsătura generală care caracterizează Congresul al V-lea de Biochimie este aceea a cercetării și a stabilirii structurii diferitelor componente ale materiei vii, a funcțiunilor biochimice, precum și a intercondiționării dintre structură și funcțiune. Importanța deosebită a acestui aspect al cercetărilor de biochimie a fost de altfel subliniată de conținutul celor două conferințe plenare, precum și de raportul acad. Sisakian (U.R.S.S.), care au tratat în mod special problema corelațiilor dintre structură și funcțiunile biochimice. Această trăsătură caracteristică subliniază de asemenea pătrunderea tot mai adîncă a biochimiei în cercetarea intimă a materiei vii, a mecanismelor și proceselor biochimice la nivel molecular și a substratului material-structural al acestor procese.

Pe de altă parte, din tematica Congresului al V-lea de Biochimie se conturează unele probleme importante, care vor profila liniile principale de cercetare ale biochimiei contemporane, precum și căile de dezvoltare ale acesteia în viitorul apropiat. Deși lucrările prezentate la Congres au abordat un număr mare și variat de probleme de biochimie, care cu greu pot fi grupate, totuși se desprind cîteva linii directoare ce pot constitui jaloanele de dezvoltare ale biochimiei actuale :

— studiul polimerilor înalți de tipul proteinelor și acizilor nucleici ;

— studiul complexelor enzimatice și al diverșilor compuși biochimici care participă la dinamica proceselor metabolice ;

— cercetarea unor probleme de biochimie cu aplicabilitate în domeniul medicinii, agriculturii, industriei alimentare.

Prima problemă abordează cunoașterea substratului material, fundamental al tuturor fenomenelor vitale, precum și a posibilităților de reproducere și transmitere a caracterelor ereditare. Aceste aspecte sînt

strîns legate între ele, se intercondiționează reciproc și de aceea delimitarea lor este practic imposibilă, deoarece abordînd problema biosintezei proteice, implicit se abordează și problema acizilor nucleici, și reciproc. Etapa la care s-a ajuns în studiul acestor biocomponente de mare importanță și semnificație biochimică este destul de avansată; se cunoaște astăzi structura spațială a acizilor nucleici, și s-a stabilit cu certitudine rolul lor ca factor inductor în transmiterea caracterelor ereditare.

Cu tot progresul realizat și în cunoașterea structurii proteinelor, lucrările în acest domeniu sînt însă mai puțin avansate; în unele cazuri, ca de exemplu pentru proteinele mai simple și de greutate moleculară mică, s-a reușit stabilirea structurii, aprecierea configurației lor spațiale și a grupărilor biologic active. Lucrările Congresului au arătat chiar posibilitatea de apreciere a structurilor și în cazul proteinelor mai complexe, rămînînd însă aceasta ca o sarcină pentru viitor.

A doua problemă a cunoscut în ultimii ani de asemenea o dezvoltare însemnată, atît în ceea ce privește studiul complex al enzimelor, cît și al diferiților compuși biochimici care intervin în reacțiile metabolice. În cadrul lucrărilor Congresului s-a arătat că enzimologia stă, alături de studiul proteinelor și acizilor nucleici, ca o parte inseparabilă în cercetarea fenomenelor biologice. Azi se cunoaște un număr destul de mare de enzime, în special prin specificul activității lor; la unele enzime se cunoaște modul de acțiune, la altele a fost determinată și structura. Din lucrările Congresului pe linia enzimologiei s-a desprins necesitatea continuării și adîncirii cercetărilor, în vederea precizării structurii și modului de acțiune al enzimelor în diferitele procese ale metabolismului.

A treia direcție principală care s-a conturat în cadrul Congresului este legată de preocuparea biochimiștilor pentru extinderea cuceririlor biochimiei și aplicațiile acesteia în alte domenii. A reieșit astfel în evidență sprijinul pe care — pe baza nivelului științific actual atins — biochimia poate și trebuie să-l dea medicinii, agriculturii, industriei fermentative și alimentare etc. Aceasta a rezultat atît din organizarea unui simpozion special în legătură cu principiile biochimice în industria alimentară, cît și din tematica unor secții, consacrată special prezentării diferitelor probleme de biochimie a plantelor și de biochimie clinică. De notat, de asemenea, că o serie de aspecte legate de biochimia aplicată au reieșit din comunicările prezentate și discuțiile purtate în secțiile de biochimie a vitaminelor și nutriției, a antibioticelor, de biochimia microorganismelor, biochimia industrială etc.

În aceeași ordine de idei trebuie subliniate și succesele obținute în legătură cu prelucrarea materiilor prime cu ajutorul enzimelor din microorganisme. Apare astfel posibilitatea folosirii pe scară tot mai largă a enzimelor în scopuri industriale, în sinteza de medicamente etc.

În afara acestor probleme mari, generale, pe care s-a axat Congresul de Biochimie, este necesară menționarea și a altor aspecte importante care au reieșit din lucrările Congresului, și anume: mecanismele de biosinteză a celor mai diferite componente biochimice din organisme; mecanismele biochimice ale proceselor biologice care se produc în organismele vii,

ca respirația, diviziunea celulară, înmulțirea, fotosinteza etc.; stabilirea bazelor biochimice ale însușirilor biologice ale materiei vii, ca excitabilitatea, adaptabilitatea la mediu, ereditatea etc.; lămurirea evoluției organismelor pe baza cercetărilor de biochimie comparată și evolutivă.

Dintre numeroasele referate și comunicări prezentate în cadrul Congresului și care au suscitat un interes deosebit, menționăm: „Originea și evoluția metabolismului" de A. I. Oparin (U.R.S.S.); „Biochimia funcțională a structurilor celulare" de N. N. Sisakian (U.R.S.S.); „Problema sintezei proteinelor" de F. Lipman (S.U.A.); „Compoziția și activitatea biosintetică a structurilor nucleare" de I. V. Zbarski (U.R.S.S.); „Genetica biochimică și evoluția" de E. Tatum (S.U.A.); „Specificitatea de specie a acizilor nucleici" de A. N. Belozerski (U.R.S.S.); „Evoluția biochimică și reflectarea fiziologică a mecanismelor biochimice la animale" de M. Florkin (Belgia); „Structura proteinelor globulare" de J. Kendrew (Anglia); „Fotochimia clorofilei și mecanismul fotosintezei" de R. Wurmser (Franța); „Mecanismul sintezei acidului desoxiribonucleic" de J. Josse (S.U.A.) etc.

Este incontestabil că nivelul științific ridicat care a caracterizat Congresul al V-lea de Biochimie este o reflectare a posibilităților pe care mijloacele moderne de investigație le pun la dispoziția cercetărilor de biochimie. Lucrările prezentate la Congres au scos în evidență în mod pregnant faptul că, în prezent, cea mai mare parte a cercetărilor de biochimie se efectuează cu o tehnică experimentală adecvată, de prim rang, cu utilizarea curentă a celor mai moderne mijloace de lucru, ceea ce conferă cercetărilor biochimice un potențial calitativ deosebit. Astăzi, cercetarea biochimică este inseparabilă de folosirea unei aparaturi moderne care, prin eficiența ei, asigură posibilitatea cunoașterii și studierii tot mai profunde a materiei vii și a proceselor vitale.

Această constatare reală a fost ilustrată și prin expoziția de aparate tehnice științifice organizată în cadrul Congresului și a cărei vizitare a constituit o documentație de un real folos pentru mulți participanți; ea a permis să se cunoască noile posibilități de utilizare și eficiența aparaturii moderne în cercetarea biochimică. În cadrul acestei expoziții au fost prezentate tipuri variate de aparate și de instrumente, atît de către U.R.S.S. și unele țări socialiste, cît și de o serie de firme din occident.

În afară de aceasta, în cadrul programului Congresului a figurat chiar o secție specială de „Aparate și metode noi în biochimie", care a oferit participanților posibilitatea de a se informa asupra tehnicilor noi în cercetarea biochimică.

Menționăm, în fine, că în cadrul Congresului a fost organizată și o expoziție de cărți și publicații în domeniul biochimiei, de către o serie de case editoriale și țări participante la Congres. Participanții au avut la dispoziție o bogată informare științifică și au putut lua cunoștință de ultimile noutăți apărute în literatura biochimică.

La Congresul Internațional de Biochimie de la Moscova, țara noastră a fost reprezentată printr-o delegație oficială de 36 persoane, formată din academicieni, oameni de știință, cercetători și specialiști care

lucrează în diferite ramuri ale biochimiei sau în alte domenii conexe biochimiei. Pe lîngă această delegație oficială, din țara noastră au mai luat parte la Congres și 120 persoane venite pe linie O.N.T. special în acest scop.

Participarea delegației țării noastre la lucrările Congresului a fost activă și a prilejuit totodată, în special pentru membrii mai tineri ai delegației dobîndirea de învățăminte utile; această participare la un congres atît de mare și important a fost deosebit de instructivă și plină de conținut.

În vederea Congresului au fost trimise din R.P.R. 50 de lucrări științifice originale, a căror listă o dăm mai jos și care au fost inserate în programul Congresului; unele din ele au fost susținute de către autori în ședințele secțiilor Congresului:

— E. Appel (Institutul de neurologie „I. P. Pavlov" al Academiei R.P.R.), *Rezultatele studiului histochimic al fosfatazelor din creier uman pe material necropsic.*

— I. Baciu, G. Benetato, S.Secăreanu, A. Cojocaru, L. Mocodean, V.Vitenschi, V.Șoituz (I.M.F., Cluj), *Influența fracțiunilor globulinice ale serului izolate prin cromatografie pe coloană de derivați celulozici, asupra fagocitozei.*

— C. Barber, I. Soare (Institutul „Dr. I. Cantacuzino"), *Separarea unui polimer al acidului γ-aminobutiric plecînd de la* Hemophilus pertussis.

— H. Beneș, M. Crăcea (Colectivul de chimioterapie al Academiei R.P.R.), *Studiul corelațiilor între puterile tuberculostatică și tuberculicidă ale unor substanțe chimioterapice și dezvoltarea rezistenței bacilului tuberculos pentru aceste substanțe.*

— Gr. Benetato, V. Neștianu, V. Benetato, O. Maior (I.M.F., București), *Studiul denaturării reversibile a proteinelor în nervii excitați în raport cu capacitatea funcțională a nervilor.*

— J. Biener, I. Potop (Institutul de endocrinologie al Academiei R.P.R.), *Acțiunea unor fracțiuni izolate din timus asupra embriogenezei și dezvoltării grefelor tumorale în ou.*

— C. Bodea, E. Nicoară, V. Tamaș (Institutul Agronomic, Cluj), *Sinteza parțială a unor noi carotenoizi cu ajutorul tetraacetatului de plumb.*

— C. Ciurea, L. Iancu (Institutul „Dr. I. Cantacuzino"), *Microsifon cu debit constant.*

— S. Comoroșan, R. Stamatescu, A. Gaspar (Spitalul clinic Fundeni, București), *Studiul proteinelor serice în diferite boli ale ficatului.*

— D. Costa-Foru (Institutul de neurologie „I. P. Pavlov" al Academiei R.P.R.), *Valoarea cuprului în creier, ficat, rinichi și sînge la șobolan după accesul convulsiv experimental.*

— G. Costescu, O. Teodorescu, I. Șoimu (I.M.F., București), *Studiul transacetilazei, carboxilazei și transaminazei în funcție de vîrsta animalului și sub acțiunea cisteinei.*

— B. Cuparencu, E. Bîrsan, A. Gavrus, J. Rusu (I.M.F., Cluj), *Unele modificări ale proteinelor miocardice în insuficiența suprarenală și ecoul lor metabolic.*

— C. Georgescu (Colectivul de chimioterapie al Academiei R.P.R.), *Studiul acizilor nucleici în funcție de vîrsta animalului și sub acțiunea cisteinei.*

— G. Gabrielescu, G. Benetato, L. Parteni, I. Boroș (Institutul de fiziologie al Academiei R.P.R.), *Cercetări privitoare la tulburările metabolismului proteic în encefalomielita demielinizantă alergică experimentală.*

— V. Gheție, L. Buzilă (Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.), *Proteinele din cotiledoane și embrionul de fasole.*

— G. Grigorescu, M. Ungureanu (I.M.F., București), *Studiul fosfolipidelor în funcție de vîrsta animalului și sub acțiunea cisteinei.*

— T. Hornet (Institutul de neurologie „I. P. Pavlov" al Academiei R.P.R.), *Asupra diagnosticului histochimic în neuroviroze și neuroalergie.*

— M. Istrati, E. Soru, F. Szabados, D. Tănăsescu, M. Paraschivescu (Institutul „Dr. I. Cantacuzino"), *Ciclul tricarboxilic la Mycobacterium tuberculosis și variantele ei rezistente la streptomicină, PAS și INH.*

— N. Luca, V. Ionescu (Institutul de neurologie „I. P. Pavlov al Academiei R.P.R.), *Schimbări ionice în maladii degenerative nervoase.*

— E. Lupu, M. Dumitriu (Colectivul de chimioterapie al Academiei R.P.R.), *Sinteza unor derivați ai sulfonamidei și tiodiazolului substituit cu tioalchil cu acțiune potențială întîrziată.*

— E. Macovschi, C. Iordache, C. Dragomirescu (Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.), *Fosfagenul în diferite stări de activitate și excitabilitate musculară.*

— I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu, M. Georgescu, D. Drăghici, E. Alamita (Institutul „Dr. I. Cantacuzino"), *Efectul citotoxic al endotoxinelor „o" și al proteinelor toxice ai germenilor Gram negativi.*

— L. Mesrobeanu, N. Mitrică, I. Mesrobeanu (Institutul „Dr. I. Cantacuzino"), *Proteinele toxice ale germenilor Gram negativi.*

— M. D. Mezincescu, E. Serediuc, P. Rosen (I.M.F., București), *Nivelul excreției diurne de arginină și glicociamină.*

— P. Grozea și colab. (Institutul de medicină internă al Academiei R.P.R.), *Glicoproteinele serice în hemopatii maligne.*

— Șt. Milcu, I. Potop. C. Ciocîrdia, N. Simionescu, G. Mreană (Institutul de endocrinologie al Academiei R.P.R.), *Influența unor fracțiuni izolate din timus asupra metabolismului și histochimiei țesuturilor.*

— N. Mison-Crighel, A. Kreindler (Institutul de neurologie „I. P. Pavlov" al Academiei R.P.R.), *Influența acceselor convulsive repetate asupra metabolismului glucido-fosforic.*

— V. Moga, L. Bertescu (Colectivul de chimioterapie al Academiei R.P.R.), *Corelații între structura, proprietățile chimice și fizico-chimice și proprietățile biologice ale unor compuși obținuți plecînd de la rășini de conifere.*

— D. Moțet-Grigoraș (Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.), *Coacervarea fracțiunilor proteice din serul sangvin uman după denaturare prin căldură.*

— I. Oeriu (Colectivul de chimioterapie al Academiei R.P.R), *Relații între structura și acțiunea antituberculoasă a unor derivați de la α-naftochinonă.*

— S. Oeriu (Colectivul de chimioterapie al Academiei R.P.R.), *Date noi în biologia vîrstelor.*

— A. Petrescu, N. Anghelescu (Institutul de neurologie „I. P. Pavlov" al Academiei R.P.R.), *Cercetări histochimice asupra mielinizării la pisică.*

— C. Pintilie, A. Solomonovici, N. Mison-Crighel (Institutul de neurologie „I. P. Pavlov"al Academiei R.P.R.), *Efectul metabolic al hipoglicemiei insulinice la neurotici.*

— E. Podhorsky, A. Topciu (Institutul „Dr. I. Cantacuzino"), *Studiul chimic al antigenilor extrași din diferite tipuri de meningococi.*

— Th. Porsche (I.M.F., Timișoara), *Activitatea uricazei adaptative în* Saccharomyces cerevisiae.

— I. Potop, E. Juvină, A. Lupulescu, C. Ciocîrdia (Institutul de endocrinologie al Academiei R.P.R.), *Acțiunea protectoare a unor fracțiuni izolate din timus asupra cancerului experimental.*

— A. Roventa, T. Horneț (Institutul de neurologie „I. P. Pavlov" al Academiei R.P.R.), *Studiu histo- și biochimic al activității fosfatazice a structurilor celulare din creier la specii cu predominanță alcalină sau acidă.*

— H. D. Schell (Institutul de biochimie al Academiei R.P.R), *Interacțiunea unor substanțe curarizante fluorescente cu proteinele serice.*

— E. Soru (Institutul „Dr. I. Cantacuzino"). *Studiul chimic al arginazei stafilococice.*

— E. Soru și colab. (Institutul „Dr. I. Cantacuzino"), *Studiul chimic al stafilochinazei.*

— D. Stavri, A. Marx (Institutul „Dr. I. Cantacuzino"), *Cercetări asupra mecanismului de sinteză a prodigiosinei de către bacilul* Serrolia marcescens.
— N. Sterescu, Z. Covăsneanu, E. Gabrielescu, B. Rosner, A. Stancu, A. Bordeianu (Institutul de fiziologie „Prof. Dr. D. Danielopolu" al Academiei R.P.R.), *Modificări biochimice în glanda tiroidă în timpul travaliului fizic.*
— M. Şerban (Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.), *Cercetarea proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie.*
— I. Tănase (Colectivul de chimioterapie al Academiei R.P.R.), *Studiul aminoacizilor din creier în funcție de vîrsta animalului și sub acțiunea cisteinei.*
— G. Tănăsescu, G. Orghidan (I.M.F., București), *Studiul polipeptidelor serice și al aminoacizilor în funcție de vîrsta animalului și a tratamentului cu cisteină.*
— M. Tigheciu-Dumitrescu, L. Enache-Perederi (I.M.F., București), *Studiul dehidrazelor și fermentului galben respirator în funcție de vîrsta animalului și sub acțiunea cisteinei.*
— O. M. Vanghelovici, C. Demetrescu (I.M.F., Timișoara), *Sinteze de noi compuși spasmolitici.*
— V. Vasilescu, V. Niculescu, S. Căpîlnă, A. Bordeianu, E. Ghizari (Institutul de fiziologie „Prof. Dr. D. Danielopolu" al Academiei R.P.R.), *Cercetări asupra compoziției chimice și efectelor biologice ale unor extracte de ficat.*
— S. Vasu (Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.), *Unele relații dintre coacervate și enzime.*
— M. Zamfirescu-Gheorghiu, I. G. Popescu, D. Velican, C. Miron (Institutul de medicină internă al Academiei R.P.R.), *Contribuții la studiul unor enzime energetice în hepatita cronică toxică experimentală.*

Din această listă, care oglindește și participarea cu lucrări a diferitelor instituții la Congres, reiese totodată și repartiția numerică a acestor lucrări pe instituții, după cum urmează:

— Colectivul de chimioterapie al Academiei R.P.R. . . . . = 7 lucrări
Institutul Agronomic Cluj . . . . . = 1 lucrare
— Institutul „Dr. I. Cantacuzino" . . . . . = 9 lucrări
— Institutul de biochimie al Academiei R.P.R. . . . . = 6 lucrări
— Institutul de endocrinologie al Academiei R.P.R. . . . . = 3 lucrări
— Institutul de fiziologie „Prof. Dr. D. Danielopolu" al Academiei R.P.R. . . . . = 3 lucrări
— Institutul de medicină internă al Academiei R.P.R. . . . . = 2 lucrări
— I.M.F., București. . . . . = 7 lucrări
— I.M.F., Cluj . . . . . = 2 lucrări
— I.M.F., Timișoara . . . . . = 2 lucrări
— Institutul de neurologie „I. P. Pavlov" al Academiei R.P.R. . . . . = 8 lucrări

Dintre aceste lucrări, 29 au fost trimise de către unități ale Academiei R.P.R., 9 de către unități departamentale, iar 12 de către catedre din învămțămîntul superior.

Aportul delegației țării noastre la Congres s-a concretizat prin prezentarea unui număr de 18 lucrări originale în diferite secții ale Congresului, prin participarea — după specialitate — la lucrările simpozioanelor și secțiilor, prin prezidarea lucrărilor la unele secții de către unii delegați, prin participarea la diverse consfătuiri.

Menționăm că lucrările prezentate de delegația Republicii Populare Romîne, din diferite domenii, ca biochimia musculară, biochimia proteinelor, biologia vîrstelor, enzimologie, biochimia medicală, biochimia plantelor, imunochimie etc., au avut un nivel științific corespunzător și s-au bucurat de apreciere; ele au dovedit totodată că cercetările biochimice de la noi se încadrează în cercetarea biochimică mondială.

Unii dintre delegați au luat cuvîntul la discuții în cadrul secțiilor la care au participat, aducînd completări sau cerînd lămuriri pe marginea lucrărilor prezentate.

Semnalăm de asemenea faptul că organizarea excelentă a Congresului, precum și atmosfera de prietenie și înțelegere reciprocă, au permis delegaților din țara noastră să stabilească o serie de legături cu cercetători și specialiști din alte țări, care lucrează în aceleași probleme. Aceasta a oferit posibilitatea unei colaborări mai strînse în diversele domenii de cercetare, cît și în vederea perfectării unor schimburi de literatură și specialiști din diferite țări.

De un real folos pentru membrii delegației noastre a fost vizitarea celor două expoziții organizate în cadrul Congresului: cea de aparate și cea de cărți. Delegații au avut posibilitatea să ia cunoștință și să se informeze direct asupra aparaturii moderne ce se folosește azi în cercetarea biochimică, precum și asupra publicațiilor și tratatelor cu conținut biochimic care au fost prezentate. Membrii delegației noastre și-au putut procura o serie de prospecte de aparate, precum și cataloage de publicații — care vor putea fi puse la dispoziția unităților respective din țară. Se poate afirma că expozițiile au ajutat mult delegației noastre la cunoașterea tehnicii noi și a bibliografiei biochimiei actuale, furnizînd sugestii utile cu privire la activitatea ce urmează să fie desfășurată în cercetările de biochimie.

★

După închiderea lucrărilor Congresului, delegația oficială romînă a participat la o excursie organizată de O.N.T. și Inturist, pe ruta Moscova-Leningrad-Kiev. Cu acest prilej, participanții la Congres au avut frumoasa ocazie de a cunoaște și alte orașe din U.R.S.S. și de a lua contact direct cu minunatele realizări ale poporului sovietic, cu activitatea sa constructivă și pașnică.

Trebuie menționat și faptul că membrii delegației noastre au avut posibilitatea să viziteze și unele institute de specialitate din Moscova și Kiev. Cu acest prilej, cercetătorii sovietici ne-au împărtășit din vasta lor experiență în toate domeniile de activitate, începînd de la modul de organizare a institutelor și pînă la organizarea și sistematizarea muncii științifice. Așa de exemplu, s-a vizitat Institutul de biochimie din Moscova, condus de acad. A. I. Oparin, Institutul de seruri

și vaccinuri din Moscova, precum și Institutul de biochimie de la Kiev, condus de acad. A. V. Palladin.

În concluzie, pentru delegația țării noastre, în special pentru cercetătorii mai tineri, membri ai acestei delegații, participarea la Congres a fost deosebit de instructivă și plină de semnificație. Acest Congres a dat posibilitatea lărgirii orizontului științific, prin luarea de cunoștință despre preocupările științifice ale diferitelor școli de biochimie, cunoașterea unor personalități marcante ale biochimiei contemporane și a opiniilor exprimate în cadrul comunicărilor și discuțiilor, cunoașterea stadiului actual al cercetărilor din cele mai diferite domenii ale biochimiei, cunoașterea modului cum gîndesc, cum abordează și cum rezolvă diferiții cercetători problemele de biochimie la care lucrează, cunoașterea liniilor directoare, de principiu, care se dezvoltă în biochimia contemporană etc.

S. Căpîlnă
Cercetător principal la Institutul de fiziologie al Academiei R.P.R.

M. Șerban
Cercetător principal la Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.

I. PROBLEME GENERALE. METODE DE CERCETARE

1 067. SCHWARTZ A., PORA E. A., KIS Z., MADAR I. şi FABIAN N., *Determinarea grupărilor —SH şi —S—S— din serul de iepure şi din diafragma izolată de şobolan.* Com. Acad. R.P.R., 1961, **XI**, 1, 45—51.

Se descrie o metodă argentometrică-amperometrică de dozare a grupărilor —SH libere şi a grupărilor —S—S— după scindarea lor în grupe —SH.

I. Tănase

1 068. ISĂCESCU D. A., URSU V. şi BILLER S., *Acţiunea oxidazică şi peroxidazică. VIII. Cromatografia pe hîrtie în urmărirea reacţiei dintre catalază, hemină sau sulfat feros (clorură ferică) cu benzidină şi H_2O_2.* Studii şi cercet. chimie, 1960, **VIII**, *3*, 431—436.

S-a pus la punct o metodă de cromatografie pe hîrtie a compuşilor porfirinici cu Fe de tipul heminei şi catalazei, cît şi a fierului din sarea feroasă sau ferică.

I. Tănase

1 069. BRUCKER W., *Date noi asupra genezei tumorilor plantelor.* Studii şi cercet. inframicrobiol., 1961, **XII**, *1*, 19—27. Referat general cu 38 indicaţii bibliografice.

D. Tănăsescu

1 070. OSTROGOVICH G. şi BACALOGLU R., *Asupra dozării biuretului în amestecuri de uree, acid cianuric, clorură de amoniu şi alte produse ce pot rezulta prin termoliza ureei.* Studii şi cercet. Timişoara, chim., 1960, **VII**, *3—4*, 277—283.

După un examen critic al metodelor existente de determinare a biuretului, autorii au elaborat următoarele două metode: o metodă indirectă, chelatometrică, constînd din determinarea, prin titrare cu o soluţie de complexon III în prezenţă de murexid, a ionului de Ni^{2+} din

complexul $(NiBiur_2)^{2-}$ şi o metodă directă, colorimetrică, prin care se măsoară extincţia soluţiei galbene a complexului $(NiBiur_2)^{2-}$. Prima metodă permite determinarea a 0,05 g biuret în concentraţie minimă de 1 g/l, cu o eroare reală probabilă de $\pm$ 0,5 % şi o eroare maximă de $\pm$ 1,0 %; metoda colorimetrică e mai puţin exactă şi mai laborioasă.

N. Luţă-Moldoveanu

1 071. MUREŞANU L. P. şi CZEISLER G., *Contribuţii la cunoaşterea felului aminoacizilor din substanţele cu azot a acizilor huminici la tipuri de sol din regiune.* Studii şi cercet. Timişoara, chim., 1960, **VII**, *3—4*, 329—334.

Substanţa azotată a acizilor huminici este în cea mai mare cantitate sub formă de proteide. În hidrolizatele acide ale solurilor s-au pus în evidenţă : histidina, arginina, acid aspartic, leucina şi izoleucina. Lizina se găseşte în cantităţi însemnate în solul brun roşcat de pădure şi ca urme în cernoziom şi podzol ; tirozina este numai în urme în cernoziom şi în cantităţi apreciabile în celelalte soluri ; valina şi fenilalanina sînt prezente numai în urme în podzol, dar abundente în celelalte soluri.

N. Luţă Moldoveanu

1 072. MINCU I. şi GEORGESCU R., *Probleme de histoenzimologie hepatică.* Med. int., 1961, **XIII**, *4*, 513—521.

Referat general cu 47 indicaţii bibliografice.

C. Şelariu

1 073. MINCU I. şi GEORGESCU R., *Enzimele serice şi valoarea lor în patologia hepatică.* Med. int., 1961, **XIII**, *5*, 641—658.

Referat general cu 73 indicaţii bibliografice.

C. Şelariu

1 074. SĂSĂRMAN A., *Dispozitiv simplu pentru realizarea anaerobiozei în cadrul unui procedeu mixt.* Microbiol., parazitol., 1961, **VI**, *2*, 177—180.

Se descrie un procedeu combinat în care oxigenul rămas după realizarea unui vid relativ este absorbit de un amestec de pirogalol şi KOH 10%. Cu acest dispozitiv s-au putut obţine culturi în suprafaţă de germeni anaerobi (*Cl. septicum, Cl. hystoliticum, Cl. tetani* etc.).

D. Tănăsescu

1 075. ROSKIN G. I., *Citochimia leucocitelor.* Morfol. norm. pat., 1960, *2*, 101—117.

Referat general cu 105 indicaţii bibliografice.

D. Cotariu

1 076. CRĂCIUN E., GEORGESCU L. şi CONSTANTINESCU S., *Cîteva aspecte biochimice ale mucopolizaharidelor.* Morfol. norm. pat., 1960, *3*, 193—201.

Referat general cu 19 indicaţii bibliografice.

D. Cotariu

1 077. BATCU V. şi BATCU A., *Unele aspecte ale biochimiei cristalinului.* Oftalmol., 1960, *3*, 221—227.

Referat general cu 8 indicaţii bibliografice.

D. Cotariu

1 078. BERHAD B. şi GOLDSTEIN I., *Toxicologia nitroaminoderivaţilor aromatici.* Rev. igienă, 1961, *1*, 1—10.

Referat general cu 65 indicaţii bibliografice.

A. Popescu

1 079. GONŢEA I., DUMITRESCU H. şi RUJINSKI A., *Contaminarea alimentelor cu metale toxice.* Rev. igienă, 1961, *1*, 11—26.

Referat general cu 4 indicaţii bibliografice.

A. Popescu

1 080. IENIŞTEA C., *Folosirea antibioticelor la conservarea produselor alimentare.* Rev. igienă, 1961, *1*, 57—62.

Referat general cu 28 indicaţii bibliografice.

A. Popescu

1 081. POPA S. V. şi FURNICĂ G., *Cercetări cu privire la protecţia chimică a organismului animal contra acţiunii nocive a radiaţiilor ionizante.* Rev. igienă, 1960, *2*, 151—164.

Referat general cu 30 indicaţii bibliografice.

A. Popescu

1 082. TONGUR V. S., *Unele probleme ale corelaţiei dintre biosinteza proteinelor şi a acizilor nucleici.* An. rom.-sov., biol., 1960, *4*, 52—75.

Referat general cu 149 indicaţii bibliografice.

L. Arnet

1 083. BLAGOVESCENSKI A. V., *Evoluţia biochimică a angiospermelor.* An. rom.-sov., biol., 1960, *4*, 96—109.

Referat general cu 23 indicaţii bibliografice.

L. Arnet

1 084. PASÎNSKI A. G. şi DEMIN N. N., *Problemele de bază ale biochimiei radiaţiilor.* An. rom.-sov., biol., 1961, *1*, 3—11.

Referat general fără indicaţii bibliografice.

L. Arnet

1 085. MILMAN L. S., *Cîteva probleme privind acizii ribonucleici din celulă.* An. rom.-sov., biol., 1961, *1*, 107—129.

Referat general cu 104 indicaţii bibliografice.

L. Arnet

1 086. BELIŢER V. A., *Despre structura proteinelor.* An. rom.-sov., biol., 1961, *2*, 52—83.

Referat general cu 170 indicaţii bibliografice.

L. Arnet

1 087. ANDRIANOVA I. G., *Metabolismul fierului în organism.* An. rom.-sov., med., 1961, *2*, 73—85.

Referat general cu 127 indicaţii bibliografice. Se prezintă şi date originale în legătură cu faptul că fierul administrat parenteral poate fi regăsit cu suficientă siguranţă în hematii numai după 6—8 ore, deoarece în primele 4 ore concentraţia mare de fier din plasmă poate duce la absorbţii pe hematii,eronînd rezultatele.

D. Moţet-Grigoraş

1 088. MACIABELI M. S., *Cu privire la nomenclatura echivalentă a factorilor de coagulare a sîngelui.* An. rom.-sov., med., 1961, *2*, 126—134.

Se prezintă tabelată o sistematizare a acestei nomenclaturi, discutîndu-se echivalența dintre diferiți factori. În tabelă se menționează și autorii care folosesc diferitele terminologii, factor important pentru studierea literaturii de specialitate.

D. Moțet-Grigoraș

II. BIOCHIMIA PROTIDELOR

1 089. IONESCU V., *Fibrinoliza și importanța ei în tratamentul trombozelor.* Viața med., 1961, **VIII**, *17*, 943—949.

Se discută importanța fiziopatologică a fibrinolizei și se descrie sistemul fibrinolitic, după care este prezentă acțiunea fibrinolizinei în tratamentul trombozelor.

D. Moțet-Grigoraș

1 090. TUSTANOVSKI A. A., *Problema raporturilor dintre precolagen și componentele colagenului în cadrul fibrilogenezei.* An. rom.-sov., med., 1961, *2*, 53—64.

Se face ipoteza că precolagenul, constituind elementul primitiv în procesul de formare a colagenului, se menține sub formă de colastromină în colagenul definitiv. Acesta se structurează ca o formațiune bifazică rezultată din sedimentarea specifică a colagenului solubil pe precolagen. Unitatea biochimică și morfologică este fibrila colagenă compusă dintr-o microfază externă (straturi de colagen solubil) și o microfază internă (filamente de colastromină). În cazuri patologice microfazele pot să nu se sudeze (fibrilogeneza în scorbut) sau să se disocieze (bolile de colagen).

D. Moțet-Grigoraș

III. BIOCHIMIA GLUCIDELOR

1 091. DANIELESCU G., BOERU V., ADERCA I. și IANCONESCU M., *Modificările metabolismului glucidic în membranele corioalantoidei „în vitro" sub influența interferonului.* Studii și cercet. inframicrobiol., 1961, **XII**, *1*, 109—115.

Interferonul scade consumul de glucoză al celulelor membranei corioalantoide *in vitro*, putîndu-se explica una din căile de acțiune ale interferonului în procesul de interferență a virusurilor.

D. Tănăsescu

IV. BIOCHIMIA LIPIDELOR

1 092. MOGA A., VĂGĂUNESCU G. şi ORHA I., *Asupra tulburării metabolismului lipidelor în poliglobulii.* Med. int., 1960, **XII**, *3*, 341—346.

Autorii au constatat mărirea colesterolemiei, lipemiei şi a β-lipoproteinelor şi au pus în evidenţă şi alte tulburări neuro-endocrine ca : hiperglicemie, eliminare mărită a 17-cetosteroizilor urinari, metabolism bazal crescut şi hipertensiune arterială.

C. Şelariu

V. ENZIME

1 093. COSTĂCHEL O. şi KIŢULESCU I., *Date experimentale asupra unei noi semnificaţii a activităţii colinesterazelor.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *1*, 19—26.

Se arată rezultatele obţinute în studiul participării colinesterazelor la sinteza acetilfosfatului ; unele aspecte ale acestei reacţii care demonstrează participarea ei la procesele legate de activitatea sistemului nervos, precum şi modificările acestei reacţii în cursul unor stări pato logice.

H. D. Schell

1 094. IDU S. M. şi COCIUMIAN L., *Consideraţii asupra transaminazelor serice şi a valorii determinării lor.* Med. int., 1960, **XII**, *8*, 1 257—1 262.

Privire de ansamblu asupra unor particularităţi ale acestor enzime şi a valorii clinice a testului, pe baza experienţei autorilor. Se dă şi metoda autorilor pentru determinarea transaminazei piruvice.

C. Şelariu

VI. VITAMINE, HORMONI, ALŢI COMPUŞI BIOACTIVI

1 095. LUPULESCU A., NEGOESCU I., NICULESCU-ZINCA D. şi COCU F., *Acţiunea unor hormoni şi extracte glandulare asupra evoluţiei guşii produsă prin regim carenţat în iod.* Studii şi cercet. endocrinol., 1960, *3—4*, 445—453.

Administrarea de hormon de creştere (GH) determină o stimulare a procesului guşogen, cu tendinţă de evoluţie malignă, în timp ce hormonul corticotrop (ACTH), cortizonul, acetatul de desoxicorticosteronă (DOCA), hormonii oestrogeni, extractul de timus, extractul de epifiză şi testosterona produc o inhibiţie a guşei.

D. Cotariu

1 096. MILCU I., NANU L. şi MARCEAN R., *Cercetări* in vitro *privind efectul epifizhormonului asupra schimburilor gazoase.* Studii şi cercet. endocrinol., 1960, *3—4*, 461—466.

Se studiază cu metoda Warburg, schimburile gazoase la nivelul diafragmei de şoarece şi şobolan cărora li s-a administrat epifizhormon. Se constată o stimulare a schimburilor respiratoare, cu creşterea citului respirator.

D. Cotariu

1 097. MILCU I., NANU L. şi MARCEAN R., *Cercetări* in vitro *privind efectul metabolic al epifizhormonului.* Studii şi cercet. endocrinol., 1960, *3—4*, 467—475.

Se studiază schimburile gazoase cît şi fixarea şi utilizarea glucozei din mediu la nivelul diafragmei de şoarece şi şobolan *in vitro*, sub influenţa epifizhormonului. Rezultatele obţinute arată o inhibiţie a consumului de oxigen, alături de o creştere a captării de glucoză din mediu, cu tendinţă la scăderea catabolismului acesteia.

D. Cotariu

1 098. CĂPÎLNĂ S., *Sinteza ATP-ului şi analiza produşilor de sinteză (AMP, ADP şi ATP).* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *2*, 353—360.

Se dau amănunte despre sinteza, purificarea şi analiza produşilor menţionaţi în titlu.

H. D. Schell

1 099. SĂHLEANU V. şi BABACA P., *Actualităţi în fiziopatologia glandelor corticosuprarenale*, Viaţa med., 1961, **VIII**, *7*, 345—354.

Se expun probleme în legătură cu reglarea secreţiei corticosuprarenalei, participarea suprarenalelor în reacţiile organismului, sistematizarea patologiei de corelaţie şi metabolice şi se prezintă cîteva date referitoare la relaţii dintre leziunea morfologică şi tulburarea funcţională a acestor glande.

D. Moţet-Grigoraş

1 100. ŠMAHEL O., HEROLD M., HEŘMANSKÝ M., VLČEK V. şi NEČÁSKOVA A. *Influenţa acidului ascorbic asupra resorbţiei sării de potasiu a fenoximetilpenicilinei (Referitor: preparat nou propus: penicilina perorală „Phenascopen").* Viaţa med., 1961, **VIII**, *11*, 617—620.

Administrarea acidului ascorbic duce la resorbţia practic totală a sării de potasiu a fenoximetilpenicilinei, care administrată singură se resoarbe din intestin doar în proporţie de circa 60%.

D. Moţet-Grigoraş

1 101. GALEA G. şi HOANCĂ O., *Antagoniştii aldosteronului în terapeutică.* Viaţa med., 1961, VIII, *17*, 905—914.

Se discută rolul aldosteronului în patogenia edemelor, trecîndu-se apoi la studiul antagoniştilor aldosteronului, a spirolactonelor, din punctul de vedere al structurii chimice, al modului lor de acţiune şi al efectelor ce se obţin în edeme şi hipertensiune arterială.

D. Moţet-Grigoraş

VII. BIOCHIMIA MICROBILOR. VIRUSURI. BACTERIOFAGI. ANTIBIOTICE. IMUNOCHIMIE

1 102. CHIOSA L., MUNŢIU L., IONESCU-STOIAN F., TĂUTU S. şi BOTTESCH A., *Relaţia dintre răspunsul la pirogene şi capacitatea de a produce anticorpi litici la iepure.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, VI, *1*, 27—33.

Există o relaţie evidentă între modul de reacţiune al iepurelui la pirogen (nucleinatul de sodiu) şi capacitatea acestuia de a produce anticorpi litici anti-oaie. Din punct de vedere practic, proba de pirogene poate constitui o indicaţie la selecţionarea animalelor întrebuinţate la producerea de seruri imune.

H. D. Schell

1 103. PETRESCU D., SCHIAU S., BOROŞ I., GHIZARI E., STOENESCU R. şi DEBĂU M., *Formarea de aglutinine în imunizarea primară la iepurii iradiaţi cu raze Röntgen.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, VI, *1*, 91—98.

Trei loturi de cîte 8 iepuri normali au fost supuşi iradierii cu o aceeaşi doză de raze X (200 r) la diferite perioade în raport cu imunizarea primară, făcută simultan cu două antigene injectate intravenos (o suspensie de bacterii omorîte şi una de hematii eterologe). Apoi s-a urmărit în paralel cu un alt lot de iepuri neiradiaţi (martorii) desfăşurarea proceselor de imunitate, în speţă formarea de aglutinine şi hemolizine, la iepurii iradiaţi. S-a constatat că iradierea cu 200 r, aplicată iepurilor cu două zile înainte de injectarea unei suspensii bacteriene, inhibă producerea de aglutinine circulante specifice, în timp ce iradierile făcute ulterior — începînd de la două zile după injecţia imunizantă — nu mai produc efect inhibitor.

H. D. Schell

1 104. PETRESCU D., SCHIAU S., BOROŞ I., GHIZARI E., STOENESCU R. şi DEBĂU M., *Formarea de hemolizine în cadrul răspunsului imun secundar la iepurii iradiaţi cu raze Röntgen.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, VI, *2*, 295—300.

Producerea de hemolizine, în cadrul răspunsului imun secundar la iepuri, a fost micşorată în urma iradierii totale cu raze Röntgen (150—300 r) aplicate cu 11 zile înaintea injectării secun-

dare a antigenului (hematii eterologe). Durata efectului inhibitor al iradierii asupra producerii de hemolizine este de 18 zile.

H. D. Schell

1 105. PORTOCALĂ R., BOERU V. şi SAMUEL I., *Reproducerea virusului gripal cu ajutorul acidului ribonucleic izolat. IV. Cercetarea ribonucleazei în ouăle embrionate de diferite vîrste.* Studii şi cercet. inframicrobiol., 1961, **XII**, *1*, 71—75.

Determinările făcute la ouăle embrionate de găină arată că în membrana corioalantoidiană şi în lichidul alantoidian concentraţia enzimei creşte proporţional cu dezvoltarea embrionului.

D. Tănăsescu

1 106. PORTOCALĂ R. şi ANDREESCU M., *Reproducerea virusului gripal cu ajutorul acidului ribonucleic virotic. V. Influenţa calităţii fenolului asupra activităţii acidului ribonucleic.* Studii şi cercet. inframicrobiol., 1961, **XII**, *1*, 77—81.

S-au cercetat impurităţile a patru tipuri de fenol (sovietic, Chemapol, Merck şi Analar). Existenţa ionilor de Pb şi de alte metale grele explică insuccesul unor experienţe. Fenolul cel mai adecvat extracţiei este cel sovietic, dar este necesară bidistilarea sa.

D. Tănăsescu

1 107. BIANCA I. şi DUMITRIU A., *Modificarea curbelor polarografice ale sîngelui de şobolan cu carcinom T 8 Quérin după inocularea virusului vaccinal.* Studii şi cercet. inframicrobiol., 1961, **XII**, *1*, 117—128.

Urmărindu-se modificarea grupelor —SH sanguine, s-a observat că treptele proteice scad, intensitatea maximă fiind în a şasea zi, cu revenire la normal după 14 zile de la inoculare.

D. Tănăsescu

1 108. MESROBEANU L., ALEXENCO E. şi MITRICĂ N., *Purification partielle de l'anatoxine et de la toxine staphylococique alpha.* Arch. roum. pathol. expér., 1960, **XIX**, *2*, 211—220.

Prin compararea a trei metode de purificare (cu $SO_4(NH_4)_2$, acid tricloracetic şi precipitare cu acid alcool) s-a observat că purificarea — atît a anatoxinei cît şi a toxinei — prin metoda acid-alcool este cea mai eficace. Studiul electroforetic (aparat Kern, electroforeză pe hîrtie şi geloză) arată dispariţia în ambele cazuri a unei fracţiuni din cele trei observate la preparatele brute. Acest lucru a fost confirmat şi prin difuziune în gel. Cromatografia aminoacizilor este identică la preparatele brute şi purificate.

D. Tănăsescu

1 109. MESROBEANU L. et TEODORESCO G., *Variation du métabolisme microbien, en fonction de la peptone utilisée dans le milieu de culture. L'activité respiratoire, la catalase et les déhydrogénases des variantes „S" et „R" de Typhi Murium.* Arch. roum. pathol. expér., 1960, **IX**, *3*, 355—365.

Calitatea peptonei care intră în constituţia mediului de cultură (s-a lucrat cu peptone Martin, Merck şi hidrolizat acid de fibrină) influenţează respiraţia (maximul respiraţiei obţinîndu-se cu peptonă-fibrină), catalaza şi dehidrazele prezentînd variaţii mai mici. Respiraţia şi activitatea catalazei variantei „S" sînt superioare celor ale variantei „R" la culturile în vîrstă de 3—8 ore, dar după 22 ore activitatea variantei „R" devine mai mare, pe cînd activitatea dehidrazică a variantei „S" este superioară în toate cazurile după 22 ore.

D. Tănăsescu

1 110. SORU E. şi TOPCIU A., *Contribution à l'étude de la structure antigénique de méningocoque. I. Préparation et étude immunologique d'un antigène isolé de méningocoque.* Arch. roum. pathol. expér., 1960, **XIX**, *4*, 542—550.

Prin extracţie cu apă la cald (60 min la 80°C) a fost izolat din trei tipuri de meningococ (A,B,C) un compus atoxic cu caracter antigenic, care administrat la iepuri produce formare de anticorpi precipitanţi. Imunologic s-a dovedit o specificitate de tip pentru antigenele A şi C şi una de grup pentru antigene B.

D. Tănăsescu

1 111. BARBER C., DIMITRIU O., VASILESCO T. şi CERBU A., *Contribution à l'étude de la structure antigénique des Brucella. I. Séparation de l'antigène M et de quelques complexes qui le contiennent.* Arch. roum. pathol. expér., 1961, **XX**, *2*, 201—213.

Pentru prima oară s-a reuşit separarea cantitativă a antigenului M, prin metode de extracţie cu fenol 90%, un polizaharid constituit din glucoză şi cu urme de manoză şi arabinoză. Antigenul M dă naştere la toate liniile caracteristice obţinute prin difuziunea în gel cu toate serurile antibrucella.

D. Tănăsescu

1 112. BARBER C., BALDOVIN-AGAPI C., BELOIU I. şi CAFFE I., *Contribution à l'étude de la structure antigénique des streptocoques non-hémolytiques (viridans). I. Méthodes d'extraction des antigènes et des polysaccharides.* Arch. roum. pathol. expér., 1961, **XX**, *2*, 219—230.

Au fost studiate, în ceea ce priveşte bogăţia lor în polizaharide, antigenele a 49 tulpini. Extracţia s-a făcut prin patru tehnici : fenol 90%, NaCl 0,90%, dezoxicolat de sodiu 2% şi HCl 1%.

D. Tănăsescu

1 113. BARBER C., BALDOVIN-AGAPI C. şi BELOIU I., *Contribution à l'étude de la structure antigénique des streptocoques non-hémolytiques (viridans). Fractionnement des antigènes isolés des streptocoques non-hémolytiques.* Arch. roum. pathol. expér., 1961, **XX**, *2*, 231—238.

Extractele obţinute, din diverşi streptococi, cu ajutorul unei soluţii de dezoxicolat de sodiu 2% au fost fracţionate prin precipitare cu HCl la pH 3,5 izolînd polizaharide şi nucleoproteine specifice. Polizaharidele, care probabil sînt de perete, sînt calitativ diferite.

D. Tănăsescu

1 114. STAVRI D. şi MARX A., *Recherches sur le mécanisme de synthèse de la prodigiosine par le* „Serratia Marcescens". Arch. roum. pathol. expér., 1961, **XX**, *2*, 287—294.

Se studiază pigmentul format din ac. glutamic în patru tulpini de *Serratia marcescens*. Sinteza are loc, probabil, prin închiderea ciclului pirolic, o moleculă de acid glutamic dînd o moleculă de acid pirolidon-carbonic. S-a observat că şi alţi aminoacizi cu patru atomi de C şi un atom de N sînt capabili să producă apoziţia pigmentului (glutamina, acizii aspartic şi asparaginic).

D. Tănăsescu

1 115. LONGHIN S., ANTONESCU S. şi OLARU V., *Dinamica rezistenţei la antibiotice a stafilococilor izolaţi din leziunile cutanate în anii 1956—1960.* Dermatovener., 1961, **VI**, *1*, 29—33.

La testarea sensibilităţii la antibiotice a 649 tulpini de stafilococi izolaţi din diverse stafilodermii în anii 1956—1960, s-a constatat o creştere a procentajului stafilococilor penicilinorezistenţi, de la 49% în 1956 la 81% în 1958, şi o scădere la 52% în 1960; rezistenţa faţă de streptomicină variază în acelaşi sens. Se constată de asemenea o creştere continuă a rezistenţei faţă de cloramfenicol (de la 13% la 30%), aureomicină (de la 8% la 33%), hostaciclină (de la 5% la 24%) şi eritromicină (de la 5% la 14%).

H. D. Schell

1 116. UJVÁRY I., BIRÓ J. şi TAMÁS G., *Consideraţii asupra rezistenţei stafilococilor faţă de antibiotice.* Dermatovener., 1961, **VI**, *1*, 43—47.

Referat general cu 29 indicaţii bibliografice.

H. D. Schell

1 117. CĂPUŞAN I., BĂLOSU P., HĂRDUŢIU D., SÎRBU I., PINTICAN I., PRECUP C. şi RADU H., *Antibiograma în stafilodermii. Studiul antibiogramei pe 1 169 tulpini de stafilococi.* Dermatovener., 1961, **VI**, *2*, 131—135.

Se constată o creştere treptată a antibiorezistenţei stafilococilor într-o proporţie de 5—10% pe an, ceea ce impune introducerea de antibiotice noi sau alegerea altor mijloace terapeutice.

H. D. Schell

1 118. SĂSĂRMAN A., HORODNICEANU T., KRANZDORF H. şi TULPAN G., *Cercetări asupra penicilinazelor bacteriene. Nota I. Producerea de penicilinază de către diferiţi reprezentanţi ai genului* Bacillus. *O metodă simplă de purificare a enzimei.* Microbiol. parazitol., 1960, V *6*, 513—522.

S-au studiat pe 18 tulpini efectele agitării, filtrării, purificării, liofilizării etc., pentru a se cunoaşte condiţiile optime de preparare a penicilinazei purificate şi liofilizate. Purificarea s-a făcut prin precipitare cu acid meta-fosforic la pH 3—3,5. Liofilizarea nu modifică activitatea enzimei. S-a stabilit şi cantitatea necesară de penicilinază pentru o hemocultură (40 u).

D. Tănăsescu

1 119. IENIŞŢEA C., DUMITRIU S. şi MAIOR O., *Cercetarea prezenţei histidin-decarboxilazei la tulpini de* Escherichia coli. Microbiol., parazitol., 1960, V, *6*, 523—529.

Enzima a fost prezentă la 31 de tulpini din cele 34 studiate, dintre care 28 patogene. Nu s-a observat nici o relaţie între alte caractere biochimice şi prezenţa enzimei. Se notează că enzima poate sintetiza cantităţi de histamină capabile să producă tulburări ale organismului prin ingerare, de către copii, a unor alimente infectate (roşii, cartofi, iaurt etc.). Dozarea histaminei din mediu s-a efectuat prin metoda biologică, folosind ileon de cobai.

D. Tănăsescu

1 120. TEODOROVICI G., FREUND S. şi BERNESCU E., *Aprecierea comparativă a principalelor metode folosite pentru determinarea rezistenţei bacteriilor la antibiotice.* Microbiol., parazitol., 1960, V, *6*, 557—564.

S-a urmărit sensibilitatea unui mare număr de tulpini de stafilococ patogen, cu diverse grade de rezistenţă la antibioticele uzuale : penicilină, streptomicină, cloramfenicol şi clortetraciclină. Metodele întrebuinţate : metoda diluţiilor şi metodele difuzimetrice a discului şi a tabletelor. Se recomandă metoda tabletelor.

D. Tănăsescu

VIII. BIOCHIMIE VEGETALĂ

1 121. DINU M., PĂDURARU I., POP M., LORINTZ T. şi VERMEŞANU N., *Cercetări privind influenţa porumbului asupra însuşirilor morfologice şi indicilor calitativi ai produselor la porcinele din rasa Marele alb.* Studii şi cercet. biol., biol. anim., 1960, XII, *3*, 311—330.

Analiza chimică arată o creştere a substanţei uscate din muşchi şi a grăsimii subcutanate, pe măsura creşterii proporţiei de porumb din raţia zilnică.

N. Luţă-Moldoveanu

1 122. BRAD I., LÁSZLÓ I., VĂLUȚĂ G. și SOTIRIU V., *Contribuții la stabilirea unor indici biochimici și fiziologici de rezistență la ger a cerealelor de toamnă.* Studii și cercet. biol., biol. veg., 1961, *2*, 233—241.

Rezistența la ger se caracterizează prin activitatea mai mică a catalazei și peroxidazei, un conținut mai mic de proteină brută, un consum de O_2 și o eliminare de CO_2 mai mici, ca și o transpirație mai scăzută. Conținutul în substanță uscată, substanțe reducătoare direct și reducătoare total, vitamină C, ca și suma glucide + lipide sînt mai mari la plantele rezistente la ger. De asemenea, apa legată este mai puternic reținută de aceste plante.

H. Filipescu

1 123. CUPCEA E. și STOICOVICI L., *Influența acizilor 2,4-diclorfenoxiacetic și monoiodacetic asupra respirației semințelor în curs de germinație.* Studii și cercet. biol., biol. veg., 1961, **XIII**, *3*, 357—369.

Acidul 2,4-D în concentrații mari (10—200 mg/l) a inhibat puternic creșterea plantulelor de porumb, dar nu a provocat modificări pregnante asupra respirației; în concentrații mici (1 mg/l) a favorizat creșterea în diametru a rădăcinii și tulpinței și a stimulat respirația. Acidul monoiodacetic, în concentrații de 200—400 mg/l, a inhibat creșterea și a scăzut nivelul respirației cu $^1/_3$ față de martor.

H. Filipescu

1 124. MUREȘANU L. P., SAMOILĂ Z. și PETRESCU C., *Contribuții la cunoașterea compoziției chimice a recoltelor de fîn obținute în anul însămînțării, la cîteva amestecuri de ierburi perene.* Studii și cercet. Timișoara, chim., 1960, **VII**, *1—2*, 193—204.

La finul la care s-au administrat îngrășăminte se constată îmbunătățirea calității, scăderea conținutului de celuloză brută, creșterea proteinei digestibile și a glucidelor reducătoare. Raportul Ca/P se îmbunătățește în special la graminee, urmate de leguminoase și rămîne aproape neschimbat la buruieni.

N. Luță-Moldoveanu

1 125. STAN S., *Cercetări morfologice, fiziologice și biochimice la plantele de tomate tratate cu substanțe stimulatoare de creștere.* An. I.C.A.R., 1959, **XXVII**, seria C, 9—33.

Tratarea inflorescențelor de tomate cu soluții apoase de 2,4-diclorfenoxiacetat de Na (10 mg/l), 2,4,5-triclorfenoxiacetat de Na (50 mg/l) sau acid beta-naftoxiacetic (50 mg/l) a provocat modificări morfologice și de structură ale fructelor și o reacție de stimulare generală a plantelor, evidențiată prin: creșterea intensității respirației în flori, fructe, frunze și vîrfuri de creștere, a activității enzimelor oxido-reducătoare, scăderea intensității transpirației frunzelor, creșterea intensității de asimilație a frunzelor și intensificarea procesului de creștere a ovarelor.

H. Filipescu

1 126. BRAD I., LÁSZLÓ I., VĂLUȚĂ GH., *Studiu fiziologic și biochimic asupra comportării unor soiuri de orz în condiții de iernare.* An. I.C.A.R., 1959, **XXVII**, seria C, 35—45.

Soiurile cele mai rezistente la ger s-au caracterizat prin procent mărit de substanță uscată, conținut ridicat în substanțe reducătoare, capacitate mare de cedare a apei libere și de reținere a apei legate, aciditate totală mai mare, precum și prin activitate mică a catalazei și peroxidazei și consum redus de oxigen.

H. Filipescu

1 127. EȘANU V. și NEGULESCU F., *Influența cîtorva microelemente asupra variației unor indici fiziologici și biochimici la plantele de porumb sănătoase și atacate de ciuperca* Ustilago zeae (Beckm.) Unger. An. I.C.A.R., 1959, **XXVII**, seria C, 59—68.

Tratamentul cu B și Cu nu a indus modificări esențiale în activitatea respirației, activitatea peroxidazică și catalazică sau conținutul în glucide. S-a constatat numai o tendință de reducere a intensității dereglării funcțiunilor în urma intervenției parazitului. Tratamentul cu Zn a dus la o reducere simțitoare a atacului și la deosebiri esențiale în ceea ce privește indicii amintiți, arătînd că în acest caz se crează un raport nou între parazit și planta gazdă.

H. Filipescu

1 128. STRAJEVSKAIA N. B., *Influența radiațiilor ionizante asupra metabolismului proteic din nucleii, mitocondriile și ergastoplasma organismului vegetal.* An. rom.-sov., biol., 1961, *1*, 12—21.

Iradierea coleoptililor din grîu cu radiații γ de Co^{60} în doză de 10 000 r, timp de 48 ore, nu influențează încorporarea metioninei S^{35} în proteinele totale ale tulpinilor, în proteinele din fracțiunea nucleară și fracțiunea de ergastoplasmă; se mărește întrucîtva încorporarea și în proteinele din fracțiunea de mitocondrii. De asemenea, se observă inhibarea creșterii germenilor cu 23,7% și micșorarea de două ori a numărului de nuclei.

L. Arnet

IX. BIOCHIMIE ANIMALĂ

1 129. PORA E. A., GHIRCOIAȘU M., *Repartiția S^{35} în diferite organe ale puilor de șobolan proveniți de la mame injectate cu metionină marcată.* Com. Acad. R.P.R., 1960, **X**, *11*, 995—999.

Metionina marcată cu S^{35} injectată la femele gravide (șobolani) intră în alcătuirea structurală a proteinelor protoplasmei celulare și se regăsește la naștere în toate țesuturile puilor de șobolan.

I. Tănase

1 130. PORA A. E., GHIRCOIAŞU M. şi PIERSICĂ T., *Dinamica fixării şi pierderii Ca^{45} de către* Planaria gonocephala (Dugès). Com. Acad. R.P.R., 1961, **XI**, *3*, 321—324.

Planaria gonocephala fixează cantităţi relativ mici de Ca^{45} din mediul ambiant. Cantitatea fixată e direct proporţională cu timpul de rămînere a animalelor în apa ce conţine Ca^{45}

I. Tănase

1 131. ROŞCA D. I., PORA E. A. şi RUŞDEA D., *Modificările glutationului hepatic şi sangvin în timpul expunerii la frig a şobolanului alb în funcţie de vîrstă.* Com. Acad. R.P.R., 1961, **XI**, *3*, 325—329.

Cantitatea de glutation hepatic şi sangvin scade la şobolanii albi în timpul expunerii la frig, datorită utilizării lui în efortul de reechilibrare termică.

I. Tănase

1 132. PORA A. E., ROŞCA I. D. şi RUŞDEA D., *Absorbţia în ţesuturi a $P^{32}O_4H_2Na$ introdus în sîngele venos al găinilor de rasă Rhode-Island.* Studii şi cercet. biol., biol. anim., 1960, **XII**, *2*, 207—214.

Dispariţia din sîngele găinilor a $P^{32}O_4H_2Na$ are loc în 3 faze : 1. în cursul a 20 circulaţii sangvine complete dispare 60% din P^{32} ; 2. în cursul celor 40 de circulaţii complete care urmează dispare încă 30%, iar 3. în cursul altor 180 circulaţii dispare restul de 10% de P^{32}. Comparînd fenomenele de homeorapie la găină şi la mamifere, s-a constatat că mecanismele homeorapice sînt mai lente la găină.

N. Luţă-Moldoveanu

1 133. PORA A. E. şi OROS I., *Repartiţia $P^{32}O_4H_2Na$ la melc în timpul amorţirii de iarnă şi în stare de veghe în timp de vară.* Studii şi cercet. biol., biol. anim., 1961, **XII**, *4*, 421—429.

Organele melcilor fixează de 5—11 ori mai puţin P^{32} iarna decît vara, excesul de P^{32} administrat iarna eliminîndu-se prin epifragm. Absorbţia P^{32} injectat în musculatura piciorului este maximă la 24—35 ore de la injecţie şi apoi după încă 13 ore cantitatea P^{32} din organe revine la valorile primei ore ceea ce indică realizarea unui echilibru între organ şi hemolimfă. În timpul trecerii de la starea de amorţire de iarnă la cea de activitate de vară hepatopancreasul furnizează celorlalte organe însemnate cantităţi de P^{32}.

N. Luţă-Moldoveanu

1 134. DINU M. şi PĂDURARU I., *Modificările morfo-fiziologice ale gestaţiei şi valorificare substanţelor nutritive la suine.* Studii şi cercet. biol., biol. anim., 1960 **XII**, *4*, 431—442

În primele 2 luni ale gestaţiei la suine se constată valorificarea mai bună a hranei, accelerarea ritmului de creştere, sporirea ritmului respirator, creşterea temperaturii corporale, mărirea

greutății și volumului ficatului, a glandei mamare, a uterului, a țesutului muscular și conjunctiv. Carnea animalelor gestante conține un procent mai mare de proteine (0,13%), de săruri minerale (0,70%) și de apă (1,29%). Autorii propun monta scroafelor cu 30—40 zile înainte de sacrificare.

N. Luță-Moldoveanu

1 135. COSTINER E., NICULESCU-ZINCA D. și VAISLER L., *Evoluția radioactivității tiroidiene și a sîngelui după marcajul iodurilor la șobolanii albi sub regim de creșcătorie.* Studii și cercet. endocrinol., 1960, *3—4*, 455—459.

S-au stabilit curbele de evoluție a radioactivității tiroidiene și sîngelui, *in vitro*, pe loturi de 10 animale, sacrificate la diferite intervale de timp după administrarea intraperitoneală de radioiodură marcată cu I^{131}. Se constată că ciclul metabolic intratiroidian al iodului se face în 48 de ore.

D. Cotariu

1 136. HOLBAN R. și SĂHLEANU V., *Modificările numerice ale eozinofilelor circulante după tratamentul cu tiroxină și hormon tireotrop.* Studii și cercet. endocrinol, 1960, *3—4*, 561—563.

Tiroidectomia produce o scădere a eozinofilelor statistic semnificativă după 20 de zile. La animalele tiroidectomizate, administrarea de hormon tireotrop dă eozinopenie după 10 zile, care dispare mai tîrziu. La animalele intacte, tiroxina dă o eozinopenie moderată, care se menține în cursul experienței. La animalele intacte tratate cu hormon tireotrop, se observă o puternică eozinopenie, în special la 10 zile după tratament. Cel mai puternic efect eozinopenic îl dă tratamentul cu cortizon.

D. Cotariu

1 137. ZIMEL H., RIVENZON A. și DOBRESCU A., *Contribuții la studiul inervației tumorilor. Nota III. Studiu comparativ al metabolismului colinergic în tumori experimentale.* Studii și cercet. endocrinol., 1960, *3—4*, 572—577.

La tumorile experimentale, sarcomul de metilcolantren și epiteliomul T_8 Guérin, grefate la șobolanul alb, metabolismul colinergic prezintă unele caractere comune (incapacitatea țesutului tumoral de a sintetiza acetilcolina și de a o lega în cenapse lipidoproteice), dar și unele deosebiri (conținut diferit în acetilcolină și activitate diferită a colinesterazei).

D. Cotariu

1 138. GLAVCEVA L., *Cercetări privind mecanismul de acțiune al largactilului asupra secreției gastrice.* Studii și cercet. fiziol., 1961, **VI**, *1*, 35—46.

Experiențele efectuate pe 8 cîini au arătat că largactilul (în doza de 2 mg/kg corp) scade secreția gastrică provocată de excitantul alimentar sau de substanțe ca insulina, pilocarpina,

histamina, atît în cazurile în care stomacul are inervaţia integră, cît şi în cazul denervării sale parţiale. Autorul admite că efectul inhibitor al largactilului asupra secreţiei gastrice se realizează atît direct asupra celulelor din glandele digestive gastrice, cît şi indirect, pe calea sistemului nervos parasimpatic.

H. D. Schell

1 139. FAIBIŞ A., IONESCU C. şi SARAGEA M., *Cercetări experimentale privind acţiunea meprobamatului asupra activităţii nervoase superioare. I. Influenţa meprobamatului asupra reflexelor condiţionate la animalul normal.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *1*, 63—72.

Studiind pe cîine acţiunea meprobamatului asupra unui stereotip de reflexe condiţionate, autorii constată că drogul administrat la animale normale determină modificări ale activităţii nervoase superioare, de intensitate şi aspect variabil, în funcţie de doză şi de modul de administrare. Dozele mai mici (sub 20 mg/kg corp) sau administrarea discontinuă a substanţei favorizează labilizarea proceselor nervoase corticale, cu apariţie de stări fazice parabiotice, ceea ce nu poate avea o influenţă pozitivă în raport cu obiectivele terapeutice urmărite prin administrarea meprobamatului.

H. D. Schell

1 140. SIMIONESCU-CARAPANCEA S. şi SUHACIU G., *Influenţa serotoninei asupra reactivităţii ţesutului cromafin al glandei medulo suprarenale.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *1*, 79—89.

Cercetările efectuate cu privire la rolul fiziologic al serotoninei în mecanismul secreţiei medulosuprarenalei, demonstrează că acest metabolit — mărind reactivitatea celulei cromafine faţă de acţiunea factorilor stimulanţi naturali (Ach şi ionul K) ai secreţiei de amine hipertensive — are un rol important în mecanismul neuroadrenergic, favorizînd secreţia de catecolamine.

H. D. Schell

1 141. BENETATO G., NEŞTIANU V., BENETATO V. şi MAIOR O., *Studiul denaturării reversibile a proteinelor din nervi în raport cu capacitatea funcţională a nervilor.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *2*, 177—191.

Determinînd cu ajutorul metodei spectrofotometrice a lui Craminer-Neuberger, gradul de denaturare a proteinelor nervoase din nervii sciatici de şobolani normali şi suprarenalectomizaţi extrase din nervi în stare de repaus, în plină excitare electrică a nervilor şi după o perioadă de refacere variind între 5 s şi 2 min autorii constată că suprastructurile proteinelor din nervi trec în timpul excitaţiei printr-un proces de remaniere sau de restructurare. La animalele suprarenoprive, la care nervii prezintă semne evidente de scădere a capacităţii funcţionale, atît denaturarea cît şi refacerea proteinelor din nervi se face între limite mult mai reduse. Există deci un paralelism între labilitatea structurală a proteinelor din nervi şi ritmul lor funcţional.

H. D. Schell

1 142. BENETATO G., PARTENI L., GABRIELESCU E., BOROŞ I. şi SUCMANSCHI M., *Cercetări privind starea coloido-chimică a proteinelor din ţesutul nervos, în raport cu modificările histochimice în encefalomielitele alergice experimentale.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *2*, 208—220.

Se studiază biochimic şi histochimic variaţiile cantitative şi calitative ale proteinelo r din creier şi măduvă la cobai în encefalomielită experimentală şi se constată o scădere a azotului, total şi a azotului proteic, precum şi o creştere a azotului neproteic faţă de animalele martor.

H. D. Schell

1 143. VASILESCU V. şi COVĂSNEANU Z., *Studiul încorporării P^{32} în acidul ribonucleic din creierul, ficatul şi muşchiul de şobolan sub influenţa trinitrotoluenului (TNT).* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *2*, 221—228.

Cercetările efectuate pe şobolani au arătat că TNT provoacă un dezechilibru profund în sinteza ARN, fapt ce elucidează cauzele tulburării metabolismului proteic şi hematopoezei constatate de autori într-o lucrare anterioară.

H. D. Schell

1 144. VASILESCU V., NICULESCU V., CĂPÎLNĂ S., BORDEIANU A. şi GHIZARI E. *Cercetări experimentale asupra compoziţiei biochimice şi efectelor biologice ale unor extracte de ficat.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *2*, 229—235.

Autorii urmăresc, pe de o parte dinamica modificărilor în metabolismul celulei hepatice studiind compoziţia cromatografică a extractelor hepatice din ficatul supus regenerării, iar pe de altă parte unele efecte biologice ale acestor extracte apoase şi deproteinizate în prealabil. Analiza cromatografică a acestor extracte de ficat, preparate în primele zile după rezecţie, arată o creştere a alaninei, leucinei, metioninei şi prezenţă de oligopeptide şi nucleotide. Injectarea la şobolani a acestor extracte produce o modificare în tabloul aminoacizilor din serul sangvin, o stimulare a proceselor proliferative, precum şi o creştere a nucleoproteinelor în ficatul animalelor tratate, dar numai dacă extractele sînt preparate în primele 5 zile de la rezecţie ; extractele recoltate mai tîrziu nu au efect.

H. D. Schell

1 145. BOŞEV N., NIKOLOVA A. şi KAVRIKOVA K., *Despre mecanismul reacţiei fagocitare a globulelor albe.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *2*, 237—243.

Cercetările efectuate pe cîini au arătat că extirparea bilaterală a ganglionului cervical superior provoacă modificarea tabloului sangvin şi a activităţii fagocitare, care se manifestă prin scăderea activităţii fagocitare a leucocitelor (timp de 7—21 zile), dispariţia eosinofilelor din sîngele periferic (2—48 ore), limfopenie (care revine la valoarea normală spre sfîrşitul primei luni) şi leucocitoză (care se normalizează cu anumite oscilaţii spre sfîrşitul primei luni).

H. D. Schell

1 146. FLORU R., COSTIN A. şi STERESCU-VOLANSCHI M., *Modificările activităţii nervoase superioare sub acţiunea noradrenalinei.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, VI, *2*, 265—272.

Administrarea intravenoasă a 15—25 mg/kg corp de noradrenalină determină la cîine o creştere a perioadelor de latenţă a reflexelor condiţionate pozitive. La 25—50 mg/kg corp are loc scăderea valorii reflexelor motorii şi de salivare.

H. D. Schell

1 147. CHIOSA L., HĂULICĂ I., COVĂSNEANU Z., ANIŢESCU M. şi MANOLESCU A., *Proprietăţile farmacologice ale unei oxime : clorura de fenaciloximpiridinium. Nota IV. Acţiunea asupra musculaturii striate. Relaţii cu colinesteraza, toxicitate.* Studii şi cercet. fiziol. 1960, V, *2*, 321—326.

Produsul studiat se comportă *in vitro* ca un anticolinesterazic, dar nu şi pe animalul întreg. La preparatul nerv-muşchi de pisică sau iepure, substanţa produce un blocaj tranzitoriu al plăcii motorii. Toxicitatea acută a produsului variază în funcţie de calea de administrare : după injectarea intravenoasă la şoareci DL_{50} este de 41,44 mg/kilocorp, iar după administrarea subcutană de 311,23 mg/kilocorp ; la şobolani valorile sînt apropiate de acestea.

H. D. Schell

1 148. FAIBIŞ A., BERNTHAL I., PĂUŞESCU E. şi SARAGEA M., *Studiul unor modificări circulatorii produse de sărurile biliare.* Studii şi cercet. fiziol., 1960, V. *2*, 371—381.

Administrarea intravenoasă a sărurilor biliare determină la cîine, o hipertensiune arterială în circulaţia generală şi o hipertensiune arterială pulmonară ce apar simultan şi durează aproximativ 2—3 min. Aceste efecte sînt mai intense la taurocolat de sodiu decît la glicocolat şi variază pentru ambele substanţe în raport cu doza folosită. Animalele icterice (icter provocat prin ligatură de coledoc) dau răspunsuri identice, însă la doze mult mai mici.

H. D. Schell

1 149. FAIBIŞ A. şi FAIBIŞ M., *Cercetări asupra mecanismului modificărilor hemodinamice provocate de acetilcolină în circulaţia pulmonară.* Studii şi cercet. fiziol., 1960, V, *3*, 601—613.

Experimentînd pe 25 cîini, autorii arată că acetilcolina provoacă modificări hemodinamice variate în circulaţia pulmonară, în timp ce în circulaţia mare ele au un aspect constant. Acest fapt ar reflecta deosebirile esenţiale de comportare ale vaselor din cele două sectoare faţă de produsul studiat.

H. D. Schell

1 150. GABRIELESCU E., BORDEIANU A. şi STERESCU N., *Histochimia proteinelor tiroidiene în efort acut şi cronic.* Studii şi cercet. fiziol., 1960, V, *4*, 747—757.

Lucrînd pe 45 de şobolani, autorii constată la animalele supuse efortului, pentru glucoproteinele tiroidiene o creştere semnificativă, pentru proteine o rămînere la valori apropiate de cele ale martorilor (cu excepţia cazului efortului prelungit pînă la limitele epuizării, cînd ele scad) şi la nucleoproteine o creştere sau o scădere, în funcţie de intensitatea efortului.

H. D. Schell

1 151. STERESCU N., COVĂSNEANU Z. şi STANCU A., *Studiu comparativ al modificărilor captării radiofosforului (P^{32}) şi radioiodului (I^{131}) în tiroida cobailor supuşi la efort.* Studii şi cercet. fiziol., 1960, V, *4*, 759—766.

Cercetările efectuate în mai multe serii pe un total de 132 cobai masculi, au arătat prezenţa unei inhibiţii funcţionale a tiroidei în ceea ce priveşte captarea iodului radioactiv în cursul efortului, însoţită de o intensificare a captării radiofosforului în tiroidă. Aceste date arată că noţiunea de inhibiţie tiroidiană de efort este unilaterală, privind doar metabolismul intratiroidian al iodului, fără a cuprinde complexitatea proceselor tisulare tiroidiene din cursul efortului fizic.

H. D. Schell

1 152. MARCU C., STROESCU V. şi SCHWARTZ R., *Acţiunea imipraminei asupra oxidării glucozei de către creierul de şobolan.* Studii şi cercet. fiziol., 1960, V, *4*, 679—685.

Imipramina, un produs nou introdus în terapeutică, deprimă procesul de oxidare a glucozei de către creierul de şobolan, cînd este adăugat *in vitro*, dar nu-l modifică atunci cînd este injectată animalului. Efectele centrale ale acestui produs nu par să depindă de procesele oxidative ale celulelor cerebrale.

H. D. Schell

1 153. PETRESCU D., SCHIAU S., BOROŞ I., GHIZARI E., STOENESCU R. şi DEBĂU M., *Variaţiile alexinemiei în cursul răspunsului imun secundar, la iepurii iradiaţi cu raze Röntgen.* Studii şi cercet. fiziol., 1960, V, *4*, 731—737.

Urmărindu-se modificările produse de iradiere în evoluţia alexinemiei la iepurii supuşi unui proces de reimunizare, s-a constatat că iradierea cu raze Röntgen în doze de 150—300 r nu modifică alexinemia animalelor de experienţă. S-a constatat de asemenea că injectarea, în imunizare secundară, a două antigene, provoacă la iepuri o creştere moderată urmată rapid de o scădere importantă, dar de scurtă durată, a alexinemiei, fenomene ce au fost mai precoce şi mai intense la iepurii iradiaţi.

H. D. Schell

1 154. PAVEL I., CHIŞIU N., CEAUŞI GH., MIHALACHE N. şi VIŞINESCU R., *Disproteinemia din sindromul umoral al ateromatozei experimentale la iepure : hipergammaglobulinemie.* Med. int., 1961, **XIII**, *2*, 265–280.

Se studiază ateromatoza experimentală provocată la iepuri cu colesterol, încercîndu-se influenţarea procesului anatomo-patologic în sens favorizant cu hialuronidază şi extract paratiroidian şi în sens protector cu extract de tiroidă, ulei de floarea-soarelui şi hidrocortizon. Doar ultimul conduce la o protecţie totală, restul nemodificînd instalarea ateromatozei. Se observă modificarea factorilor lipidici din ser, cu alterarea echilibrului proteic, caracterizată mai ales prin hipergammaglobulinemie.

C. Şelariu

1 155. GÜNDISCH M. şi FESZT T., *Date histochimice în legătură cu dinamica modificărilor activităţii esterazei în ficatul şobolanilor intoxicaţi cu cloroform.* Morfol. norm. pat., 1960, *2*, 149–156.

La şobolani intoxicaţi cu cloroform, în parenchimul hepatic lezat se produc modificări importante atît în ceea ce priveşte localizarea, cît şi activitatea fosfatazei alcaline, acide şi a lipazei.

D. Cotariu

1 156. POPP I. şi IONESCU E., *Contribuţii la studiul modului de acţiune al 3,4-benzpirenului asupra celulelor tumorilor experimentale Ehrlich şi Yoshida.* Morfol. norm. pat., 1960, *2*, 165–172.

Autorii elaborează o metodă de determinare cantitativă a 3,4-benzpirenului înglobat în celulele tumorale vii, pornind de la cercetări anterioare ale lui A. Graffi. Rezultatele obţinute în cazul celor 2 tumori analizate au o valoare de test funcţional, putînd fi aplicate în cercetările de patogenie tumorală. Se arată de asemenea rezultatele studiului citologic şi cromatografic al ţesutului tumoral după tratamentul cu benzpiren.

D. Cotariu

1 157. GÜNDISCH M., FESZT T., BARBU Z. şi BORŞ M., *Studiul histochimic asupra fosfatazei alcaline în tuberculoza experimentală influenţată prin clorpromazină.* Morfol. norm. pat., 1960, *3*, 229–234.

Administrarea zilnică de largactil (10 mg/kilocorp) la cobaii infectaţi cu micobacterii tuberculoase ($H_{37}Rv$) accelerează şi agravează producerea de leziuni tuberculoase, reflectată de asemenea prin modificările activităţii fosfatazei alcaline la nivelul leziunilor.

D. Cotariu

1 158. DRĂGAN M., *Cercetări asupra acțiunii metioninei în metabolismul lipidic al celulei hepatice, modificat prin clorpromazină.* Morfol. norm. pat., 1960, *3*, 257—262.

Metionina administrată zilnic în doze de 0,25 ml sol. 3%, timp de 16 zile, șobolanilor albi masculi, se comportă ca un stimulent al factorilor neuro-endocrini care concură la depozitarea grăsimilor în ficat. Se pare că acțiunea metioninei asupra metabolismului lipidic al ficatului ar fi inhibată de clorpromazină, în dependență de reactivitatea diferită a animalelor.

D. Cotariu

1 159. VEIDENFELD R., DOBRESCU D. și LESCOVAR A., *Cercetări experimentale privind soluția glucozată 5%.* Pediatria, 1960, **IX**, *2*, 121—128.

Se studiază influența acestei soluții asupra echilibrului osmotic la hematii și la celula musculară. Rezultatele nu sînt concludente pentru hematii. În privința mușchilor (de diferite animale și de om), s-a constatat că pentru buna lor funcționare este necesar un mediu extracelular cu o concentrație de NaCl ce nu trebuie să scadă sub un anumit nivel, chiar în prezența glucozei.

C. Șelariu

1 160. MĂNESCU S., NEGOESCU I., LUPULESCU A. și DIACONESCU M., *Cercetări asupra acțiunii gușogene a manganului.* Rev. igienă, 1960, *4*, 305—312.

Manganul face parte dintre microelementele gușogene. Administrarea lui la șobolani (0,4 mg Mn/kilocorp/zi, timp de 102 zile) a determinat creșterea în greutate a animalelor, scăderea iodului proteic din sînge, însoțită de mărirea proporției celui eliminat prin urină, și coborîrea metabolismului bazal. Se dau și rezultatele unor examene anatomopatologice făcute pe tiroidă și hipofiza animalelor de experiență.

A. Popescu

1 161. UȘAKOV B. P. și KUSAKINA A. A., *Labilitatea și conservatismul adaptării celulelor animale, însușiri care se manifestă la nivelul proteinelor.* An. rom.-sov., biol., 1961, *2*, 84—100.

Studiul termorezistenței organismului, a țesutului muscular și a colinesterazei tecii musculo-cutanate, precum și al activității colinesterazei a fost efectuat la lipitori medicinale, crescute la temperaturile de 2—4, 18—20 și 31—33°C în ziua a 5-a, a 15-a, a 30-a și a 150-a de aclimatizare. Datele obținute duc la o discuție privitoare la labilitatea și conservatismul adaptării la nivelul proteinelor, precum și la importanța acestei probleme în procesul adaptării organismului la condiții variabile de mediu.

L. Arnet

1 162. KUZNEŢOVA N. E., *Modificările substanţelor neurohumiale din sînge în cursul bolii actinice cronice experimentale.* An. rom.—sov., med., 1961, *2*, 86—94.

Histamina creşte în perioada iniţială a iradierii, apoi scade la nivelul iniţial, crescînd după aceea din nou puţin. Cromogenii adrenergici cresc în perioada iniţială, în timp ce cantitatea infimă de adrenalină existentă înainte de iradiere dispare. Ulterior, cromogenii adrenergici scad sub nivelul iniţial, uneori chiar dispar, în timp ce adrenalina creşte pînă la de trei ori nivelul iniţial. La doze şi mai mari se revine la nivelul iniţial. Acetilcolina creşte de 3—6 ori, apoi scade la normal, crescînd din nou la doze masive. Activitatea colinesterazică scade întîi, pentru ca apoi să crească pînă la nivelul iniţial sau chiar să-l depăşească. La iradieri masive activitatea colinesterazică scade din nou.

D. Moţet-Grigoraş

X. BIOCHIMIE MEDICALĂ

1 163. CÎRSTEA M., CLEJAN L., GHIZARI E. şi NICOLAESCU T., *Cercetări asupra valorii testului histaminopexiei serice pentru diagnosticul afecţiunilor alergice.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *1*, 73—78.

Testul histaminopexiei serice nu poate constitui un criteriu pentru afirmarea sau excluderea naturii alergice a unei afecţiuni.

H. D. Schell

1 164. NIŢESCU I., CONSTANTINESCU A. şi MIHĂIŢĂ M., *Electroforeza la astmatici în cursul oxigenoterapiei.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *1*, 145—148.

Examenul electroforetic al serului sangvin în astmul bronşic a permis determinarea duratei optime a tratamentului cu oxigen şi întreruperea lui o dată cu revenirea la normal a fracţiunilor proteice. Examenul electroforetic a permis de asemenea urmărirea evoluţiei bolii.

H. D. Schell

1 165. CĂPÎLNĂ S., *Studiul biochimic al chilului în funcţie de alimentaţie la o bolnavă cu malformaţie a organelor genitale.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *1*, 149—156.

Se studiază variaţiile compoziţiei unei secreţii chiloase, în funcţie de regimul alimentar, urmărindu-se azotul total, glucidele, lipidele, precum şi aspectul proteino-, glucido- şi lipidogramei.

H. D. Schell

1 166. MITROIU O., POPA M., NEGREANU W., BÎLCU M., POPPER M., KAUFMANN S., NICULESCU V. şi VANCOV Z., *Diagnosticul diferenţial al icterelor survenite în cursul*

tratamentului cu acid para-aminosalicilic (PAS) prin dozarea aldolazei serice. Studii şi cercet. inframicrobiol., 1960, **XI**, *1*, 125—131.

Tratamentul cu PAS, deşi nu lezează parenchimul hepatic, poate determina apariţia unui icter obstructiv şi poate constitui o cauză favorizantă pentru hepatita epidemică. Testul aldolazei este o probă utilă în diagnosticul diferenţial al icterelor.

D. Tănăsescu

1 167. ATHANASIU P., ANDREESCU M. şi IALOMIŢEANU V., *Studiul serotoninei în hepatita epidemică.* Studii şi cercet. inframicrobiol., 1961, **XII**, *1*, 129—135.

Determinările (pe 250 de cazuri) ale 5 hidroxi-indolaceticului (5-HIA) urinar, un catabolit al serotoninei, la bolnavii de hepatită inframicrobiană, au arătat că valorile cresc după 7 zile de boală şi scad progresiv o dată cu evoluţia bolii spre vindecare. Curba eliminării 5-HIA urinar urmăreşte destul de fidel evoluţia bolii.

D. Tănăsescu

1 168. BUŞILĂ V. T., VASILESCU I., POPIAN R., VENTURINI E., ELIAS S. şi ELIAS M., *Disproteinemia în trichinoza umană.* Studii şi cercet. Timişoara, med., 1960, **VII**, *3—4*, 235—259.

În cursul trichinozei se stabileşte o disproteinemie care priveşte atît conţinutul în proteine totale, cît şi fracţiunile proteice, în sensul hipoproteinemiei totale, hipoalbuminemiei şi creşterii tuturor fracţiunilor globulinice, cu excepţia β-globulinelor. Corticoterapia modifică în general în sens pozitiv proteinemia totală dar influenţează slab hipoalbuminemia.

L. Arnet

1 169. ŢÎRLEA P. şi ANGHELESCU M., *Reacţii alergice la antibiotice şi sulfamide, observate în clinica dermato-venerologie din Timişoara.* Dermatovener., 1961, **VI**, *3*, 237—244.

Se semnalează 58 de cazuri din ultimii trei ani, care prezintă manifestări cutanate ale sensibilizării la antibiotice şi chimioterapice şi se recomandă unele măsuri menite să prevină sau să reducă această sensibilizare.

H. D. Schell

1 170. ZOSIN C. şi JECU A., *Despre raportul dintre natriemie şi osmolaritatea totală a serului.* Med. int., 1960, **XII**, *6*, 835—841.

Autorii au stabilit existenţa unui raport (0,44 $\Delta t/\Delta$ Na) între Na (Δ Na) şi osmolaritatea totală (Δ t) a serului (determinată prin punctul crioscopic) şi au constatat a fi 1 la normali şi variată în cazuri patologice renale ; poate fi întrebuinţată ca test de prognostic.

C. Şelariu

1 171. BUŞILĂ V. T., DRAGOMIRESCU M., CRIŞAN I. şi POPIAN R., *Activitatea colinesterazei serice în ansamblul biologic al hepatitelor epidemice.* Med. int., 1960, **XII**, *8*, 1 147—1 154.

Se prezintă pe 100 cazuri, confruntarea activităţii colinesterazice comparativ cu alte probe de laborator. În ordine descrescîndă, rezultatele activităţii colinesterazice corespund probelor de coagulare (81 %), indicelui de conjugare a bilirubinei (72 %) şi probelor de disproteinemie (sub 60 %).

C. Şelariu

1 172. TORJESCU V., TĂNĂSESCU M., CEAUŞU EM., PÎRVU D., PARASCHIV D. şi CALOTĂ M., *Precipitarea seromucoidului în hepatita epidemică.* Med. int., 1960, **XII**, *8*, 1 263—1 266.

S-a cercetat sedimentarea seromucoidului, comparativ cu alte probe ca: aldolazemia, timolul, Kunkel, Gross şi cadmiu. Se constată valori foarte scăzute în primele două săptămîni de boală, cu revenire la normal spre convalescenţă.

C. Şelariu

1 173. TUDOR L., *Valoarea cercetării histochimice a citocromoxidazei în elementele sangvine şi medulare în leucoze şi în unele forme de boală canceroasă. Nota I.* Morfol. norm. pat., 1960, *4*, 333—338.

Se arată că citocromoxidaza prezintă constant la omul sănătos reacţie pozitivă în elementele celulare ale sîngelui periferic şi scădere a activităţii atît în leucoze (sînge periferic şi măduva oaselor) cît şi în cancer (sînge periferic).

D. Cotariu

1 174. IOANID N., BORŞ GH. şi POPA I., *Otrăviri cu săruri de bariu. Contribuţii medico- şi chimico-judiciare.* Morfol. norm. pat., 1960, *4*, 369—372.

Se prezintă rezultate asupra repartiţiei bariului solubil şi insolubil în diferite organe, într-o serie de cazuri de accidente mortale. Repartiţia Ba este în ordine descrescătoare (în afară de stomac) în sînge, ficat, inimă, splină, plămîni.

D. Cotariu

1 175. SEGAL N., SILBERSTEIN C. şi ROMA E., *Note preliminare asupra încercărilor terapeutice cu „agenţi chelaţi" în corpii străini feroşi intraoculari cu sideroză.* Oftalmol., 1960, *3*, 269—275.

Se arată că utilizarea sulfactinului (soluţie uleioasă de 5 % ditiopropanol) în 2 cazuri (unul cu corp străin intraocular şi celălalt cu o sideroză postcorp străin) produce o ameliorare

netă. Analizele efectuate au demonstrat că sub influența acestei medicații se produce o creștere a Fe seric și în același timp creșterea eliminării sale urinare.

D. Cotariu

1 176. TURCHETTI A. și PAGLIARO L., *Aspecte metabolice ale ficatului diabetic (studiu enzimologic)*. Viața med., 1961, **VIII**, *10*, 545—550.

Ficatul diabetic revarsă în sînge mai multă glucoză decît în mod normal. Cererea crescută de glucoză-6-fosfat ce rezultă, nu este satisfăcută de o captare mărită a glucozei alimentare, care este dimpotrivă redusă, ci de sinteza glucozo-6-fosfatului probabil din amino-acizi, iar într-o măsură mai mică, și nu întotdeauna, din lactat. Față de normal, la diabetic activitățile glucozo-6-fosfatului, transaminazei glutamic-acetice, transaminazei glutamic-piruvice, dehidrogenazei lactice și a fructozo-1,6-difosfatazei cresc sensibil, în timp ce activitatea glucokinazei scade.

D. Moțet-Grigoraș

1 177. VILLA L. și BALLABIO C. B., *Considerații asupra patogenezei hiperuricemiei bolnavului de gută*, Viața med., 1961, **VIII**, *10*, 551—554.

Hiperuricemia în gută s-ar datora pe de o parte unei producții crescute, pe de altă parte unei eliminări reduse. S-ar părea totuși că esențială este deficiența eliminatorie, fără care chiar o hiperproducție nu ar duce la creșterea cantității totale de acid uric.

D. Moțet-Grigoraș

1 178. LAGUTINA N. I., *Studiul coagulării sîngelui în boala actinică acută*. An. rom.-sov., med., 1961, *2*, 99—103.

În boala actinică acută, tromboplastinogeneza este profund tulburată, ceea ce se agravează în unele cazuri și prin acumularea în sînge de heparină liberă. Aceste tulburări constituie probabil factorii principali ai hemoragiilor în boala actinică.

D. Moțet-Grigoraș

1 179. GOSDEEVA K. V., KOSEAKOV K. S., PAVLOVA L. M. și POPEL L. V., *Modificările unor proprietăți ale fibrinogenului în cursul bolii actinice*. An. rom.-sov., med., 1961, *2*, 104—108.

Procesul de coagulare, precum și formarea și retracția chiagului în boala actinică sînt dereglate nu numai din cauza unor cantități insuficiente a componentelor plastice și trombocitare, ci și din cauza unor modificări calitative ale fibrinogenului, care își pierde proprietatea de a se coagula cu o viteză normală, iar retracția chiagului format devine insuficientă.

D. Moțet-Grigoraș

1 180. SKOPICENKO N. F., *Tulburările funcțiilor hepatice în cancerul visceral.* An. rom.-sov., med., 1961, *3*, 18—26.

Explorarea funcțională a ficatului poate pune în evidență modificările din organismul canceros, cu mult înainte de apariția caşexiei. Ea are valoare prognostică în unele cazuri, după intervenția chirurgicală, deoarece diminuarea capacităților funcționale ale ficatului poate precede evidențierea clinică a recidivei. În cazul insuficienței funcționale, în pregătirea pentru operație sînt necesare măsuri pentru micşorarea gradului de intoxicație a organismului şi ameliorarea funcțiilor hepatice.

D. Moțet-Grigoraş

1 181. BARANOV V. G., *Menopauza şi patogenia unor tulburări din perioada climaterică.* An. rom.-sov., med., 1961, *3*, 27—36.

Se discută modificările hormonale în perioada menopauzei şi urmările asupra organismului. Se face legătura cu anumite stări patologice care apar mai frecvent după menopauză, ca : diabet zaharat, hipertensiune, adipozități, hipercolesterolemii, ateroscleroză, modificări în activitatea altor glande şi în sistemul nervos. În legătură cu aceste tulburări se propun tratamente hormonale.

D. Moțet-Grigoraş

1 182. MAEVSKI V. E. şi BERENSHI P. I., *Influența ganglioplegicelor asupra diurezei şi eliminării bromului radioactiv şi iodului radioactiv prin rinichi.* An. rom.-sov., med., 1961, *3*, 173—177.

Substanțele ganglioplegice : dicolina, hexoniul şi pentamina exercită o acțiune inhibitoare asupra diurezei, care poate folosi şi drept test pentru determinarea intensității şi duratei de acțiune a acestor substanțe. Pahicarpina intensifică diureza. Pentamina inhibă eliminarea Br^{82} şi I^{131} prin urină în perioada inhibării diurezei, iar eliminarea acestora nu e paralelă cu cantitatea de urină excretată.

D. Moțet-Grigoraş

XI. BIOCHIMIA NUTRIȚIEI

1 183. PINTEA V., VINTILĂ I. şi CRISTEA N., *Modificări electroforetice în serul sangvin al gîştelor supuse îndopării.* Studii şi cercet. biol., şt. agric., Timişoara, 1961, **VIII**, *1—2*, 31—42.

Îngrăşarea forțată a dus chiar după primele 10 zile, la creşterea semnificativă a fracțiunii albuminice şi la scăderea β-globulinelor, proteinemia totală şi celelalte fracțiuni proteice rămînînd nemodificate. Administrarea colinei, concomitent cu supraalimentația forțată, se manifestă numai în prima decadă, prin frînarea trecătoare a creşterii albuminelor şi printr-o creştere

de scurtă durată a α_2-globulinelor. Iradierea cu raze X (0,015 r) a determinat o creştere apreciabilă a albuminelor şi modificări neuniforme ale fracţiunilor globulinice.

H. Filipescu

1 184. GLIGOR V., *Folosirea microelementelor în creşterea porcilor*. Probl. zoot. vet., 1961, *6*. 33—44.

Administrarea în hrană a unui supliment de microelemente (Fe, Cu, Co, Mn, Zn şi I) a influenţat semnificativ indicii fiziologici cît şi pe cei hematici (numărul eritrocitelor, hemoglobina, proteinele totale şi albuminele au crescut, iar globulinele au scăzut). Valoarea γ-globulinelor a crescut în cazul lipsei Zn şi a scăzut în cel al lipsei Fe din suplimentul de microelemente. Nu s-au constatat modificări chimice semnificative în compoziţia chimică a cărnii slăninei, osînzei. Fibra musculară a fost în general mai fină.

H. Filipescu

XII. BIOCHIMIE TEHNICĂ
XIII. FARMACOLOGIE, TOXICOLOGIE

1 185. PÎSLARU V., *Date experimentale cu privire la toxicitatea insecticidului „Cebetox"*. Rev. igienă, 1961, *1*, 27—31.

S-a cercetat pe şoareci, şobolani albi şi cobai toxicitatea preparatului Cebetox, folosit la protejarea plantelor împotriva unor insecte, găsindu-se că el este cel mai toxic insecticid din categoria alchiltiofosfaţilor. Doza minimă letală este de 0,5—0,7 mg/kilocorp. Se recomandă protecţia indivizilor care îl manipulează.

A. Popescu

1 186. SPORN A. şi SCHÒBESCH O., *Cercetări cu privire la toxicitatea butiloxitoluolului (BHT)*. Rev. igienă, 1961, *2*, 113—119.

Experienţe făcute pe 80 şobolani albi au arătat că administrarea butiloxitoluolului în concentraţie de 0,2 % are ca efect încetinirea refacerii proteinelor după foame, stimularea creşterii animalelor, însoţită de scăderea azotului hepatic, încărcarea cu grăsimi a ficatului şi concentrarea vitaminei C în suprarenală. Datorită toxicităţii sale, se recomandă interzicerea folosirii BHT-ului ca antioxidant alimentar.

A. Popescu

1 187. GOLDSTEIN I., *Modificări ale citocromoxidazei şi succindehidrazei cerebrale în intoxicaţia experimentală cu nitrobenzen*. Rev. igienă, 1961, *2*, 145—149.

Experienţe făcute pe 20 şobolani albi au arătat că intoxicarea cu nitrobenzen (administrat subcutan în doză de 0,64 g/kilocorp) are ca efect creşterea activităţii citocromoxidazei cerebrale şi scăderea activităţii succindehidrazei cerebrale. Se sugerează utilizarea determinării activităţii succindehidrazice ca test pentru evidenţierea intoxicaţiei.

A. Popescu

1 188. GABOR S., *Modificările catalazei sangvine în intoxicația cronică experimentală cu benzen și monoclorbenzen.* Rev. igienă, 1960, *3*, 209—215.

La șobolan, activitatea catalazică a sîngelui suferă modificări precoce (scădere, revenire la normal, creștere) în urma inhalării aerului impurificat cu benzen (0,1—1,5 mg/l aer). Se sugerează determinarea activității catalazice sangvine ca mijloc precoce de diagnostic al intoxicațiilor cu benzen sau monoclorbenzen la muncitorii care manipulează aceste substanțe.

A. Popescu

1 189. GAVRILESCU N., SENCHEA AL., TEODORESCU C. și RAFAILĂ E., *Cercetări experimentale privind expunerea cronică la vapori de benzină.* Rev. igienă. 1960, *3*, 223—227

Expunerea iepurilor la vapori de benzină (6—7,5 mg/l aer) cîte 5 ore zilnic, timp de 60 zile, are ca efect scăderea și apoi creșterea, peste nivelul inițial, atît a lipemiei totale, cît și a colesterolemiei.

A. Popescu

1 190. SCHÖBESCH O., *Cercetări cu privire la toxicitatea acută a antioxidanților butiloxitoluol și acid nordihidroguaiaretic.* Rev. igienă, 1961, *3*, 243—253.

Cercetările s-au făcut pe dafnii, șoareci, șobolani și cobai. Din urmărirea la șobolani a variației greutății animalelor, stării generale, greutății suprarenalelor, conținutului în vitamină C din suprarenale, catalazemiei și hemogramei, s-a ajuns la concluzia că cele două substanțe studiate prezintă toxicitate acută redusă. Cercetările făcute pe dafnii au arătat însă că substanțele au toxicitate mare.

A. Popescu

DIN ACTIVITATEA INSTITUTULUI DE BIOCHIMIE AL ACADEMIEI R.P.R.

În cursul anului 1960, cercetătorii Institutului de biochimie au obținut o serie de rezultate în citeva din domeniile fundamentale ale biochimiei. Astfel, s-au stabilit unele corelații între gradul de diferențiere a fracțiunilor proteice din creier și gradul de evoluție filogenetică a creierului; s-a elaborat o nouă ipoteză de lucru asupra formării coacervatelor și s-a reușit ca prin coacervare să se stabilească o metodă nouă de cercetare a stării și labilității proteinelor din seruri normale și patologice; s-au obținut date noi și interesante în ceea ce privește deosebirile dintre proteinele embrionului și acelea ale cotiledonului, deosebiri care ușurează înțelegerea schimbului proteic ce are loc între aceste două formațiuni în procesul germinativ; s-au adus noi contribuții la cunoașterea biochimismului celular, în problema bazelor biochimice ale excitabilității musculare și în cercetarea procesului de dezaminare la plante; s-au cercetat pentru prima dată, relațiile dintre enzime și un coacervat pe bază de proteine native, specifice organismului omenesc; s-a dovedit posibilitatea asocierii substanțelor pectice cu proteinele și s-a arătat că substanțele pectice folosite ca înlocuitori macromoleculari de plasmă sangvină pot forma *in vitro* coacervate cu proteinele serului sangvin; s-a arătat că substanțele relaxante musculare formează complecși fluorescenți cu anumite fracțiuni ale proteinelor musculare etc.

Dintre lucrările încheiate, un număr de 6 lucrări au fost trimise — sub formă de rezumat — pentru a fi inserate în lucrările Congresului Internațional de biochimie de la Moscova, din 10—16 august 1961.

În cursul anului 1960 acad. prof. E. Macovschi, directorul Institutului de biochimie, a participat la următoarele manifestări științifice internaționale: al III-lea Simpozion Internațional despre problemele de bază ale biologiei de la Berlin, unde a prezentat lucrarea „Materia vie și funcția biologică a moleculelor proteice"; al VI-lea Congres Internațional pentru substanțele vitale și de nutriție, organizat la Baden-Baden (R.F.G.), unde a prezentat lucrarea „Ultimele cercetări în problema originii vieții pe pămînt"; al V-lea Simpozion Internațional în problemele actuale de biologie în medicină, de la Bingen am Rhein (R.F.G.), unde a prezentat lucrarea „Relații între fermenți și coacervate ca model al proceselor biochimice primare pe protoproteine", și la Conferința Internațională de vitamine de la Sofia, unde a prezentat un referat despre cercetările Institutului de biochimie în domeniul vitaminelor.

Tot în cursul anului 1960, din rîndurile cercetătorilor, tov. Șelariu Cecilia a fost pentru o lună în U.R.S.S., în schimb de experiență.

Institutul de biochimie a primit în cursul anului 1960, vizita a numeroşi oameni de ştiinţă de peste hotare, care s-au interesat de organizarea şi activitatea Institutului, şi printre care menţionăm :

— A. Pisarevski de la Institutul de medicină şi biologie al Academiei de Ştiinţe din Berlin ;

— Dr. W. Nordheim şi ing. W. Heumann de la Berlin-Buch, care au ţinut o prelegere în institut despre lucrările lor personale ;

— I. Friedemann, din R.D.G.

— Ludwig Straka, din R. S. Cehoslovacă ;

— Prof. Dr. I. Cernacek, din R.S. Cehoslovacă ;

— Dr. Fr. Hanzal, din R.S. Cehoslovacă ;

— Dr. Nyilasi Janus, din R. P. Ungară ;

— Dr. I. Hunale, din R.P. Ungară ;

— Prof. Dr. A. Paszewski, din R.P.Polonă.

În colaborare cu Societatea Ştiinţelor Medicale, secţia de fiziologie normală şi patologică, biochimie şi farmacologie, Institutul de biochimie a organizat în ziua de 9 iulie 1960 o consfătuire pe ţară în problema substanţelor curarizante. Materialul prezentat cu această ocazie a fost publicat în nr. 4 din 1960 al revistei „Studii şi cercetări de biochimie". În tot cursul anului au continuat şedinţele Cercului de biochimie medicală şi ale cercului de biochimie generală, ale căror dări de seamă sînt publicate cu regularitate în revista „Studii şi cercetări de biochimie".

În primul trimestru al anului 1960 s-au organizat în cadrul institutului o serie de cursuri-conferinţe cu privire la prelucrarea statistică a datelor experimentale, ţinute de prof. H. Sluşanschi.

În colaborare cu S.R.S.C., s-a organizat un ciclu de conferinţe săptămînale intitulat „Biochimia şi viaţa", pe lîngă conferinţele de popularizare care s-au ţinut pe linie S.R.S.C. în capitală şi în provincie de către acad. prof. E. Macovschi şi o serie de cercetători din institut.

Biblioteca institutului s-a îmbogăţit cu 99 titluri de cărţi noi şi cu 36 abonamente noi la diferite periodice străine.

Numeroase lucrări ale institutului au fost solicitate de diverşi cercetători de peste hotare.

În cursul anului 1960, tov. Vaicum Lidia, asistentă la catedra de chimie generală a Institutului de construcţii, şi-a susţinut teza de dizertaţie pentru obţinerea titlului de candidat în ştiinţe chimice-biochimice, lucrată sub conducerea acad. prof. E. Macovschi.

Şi în cursul anului 1961, cercetătorii Institutului de biochimie au obţinut o serie de realizări importante pe tărîmul biochimiei. S-ar putea menţiona : descoperirea faptului că teoria lui D. Nachmansohn cu privire la rolul fosfagenului în excitabilitatea musculară nu corespunde realităţii ; s-a arătat că mitocondriile de la două organe deosebite au un fond proteic comun ; s-a găsit că microelementul cupru are un remarcabil efect protector asupra peroxidazei din porumb, împiedicînd denaturarea ei de către soluţii foarte concentrate de uree ; s-a arătat că acizii pectic şi pectinic pot forma coacervate cu gelatina şi cu proteinele din serul sangvin uman ; s-a arătat că denaturarea substanţei proteice din coacervatul ser sangvin uman-gumă arabică se repercutează asupra activităţii catalazei adăugate în lichidul încojurător etc.

Între 10 şi 16 august 1961, în cadrul celui de al V-lea Congres Internaţional de biochimie care a avut loc la Moscova, s-au prezentat următoarele lucrări din partea Institutului de biochimie :

— Acad. E. Macovschi, C. Iordache şi C. Dragomirescu, *Fosfagenul în diferite stări de excitabilitate şi activitate musculară.*

— H. D. Schell, *Interacţiunea unor substanţe curarizante fluorescente cu proteinele serice.*

— M. Şerban, *Studiul proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie.*

— S. Vasu, *Unele relaţii între coacervate şi enzime.*

De asemenea, la Secretariatul Congresului au fost depuse lucrările :

— V. Gheţie şi L. Buzilă, *Proteinele din cotiledonul şi embrionul de fasole.*

— D. Moţet-Grigoraş, *Coacervarea fracţiunilor proteice din serul sangvin uman denaturat prin căldură.*

Din partea Institutului au participat la Congres acad. E. Macovschi şi cercetătorii Tr. Rădulescu, V. Alexandrescu, M. Şerban, H. D. Schell, C. Şelariu, S. Vasu, N. Luţă-Moldoveanu şi O. Zaharia.

În cursul anului 1961, acad. E. Macovschi a fost invitat să participe la cîteva manifestări ştiinţifice internaţionale, ca Congresul de terapie de la Weimar şi Congresul Internaţional de biofizică de la Stockholm, precum şi pentru a ţine o serie de conferinţe la Rehovat, Tel-Aviv şi Ierusalim.

Institutul de biochimie a primit şi în cursul acestui an vizita a numeroşi oameni de ştiinţă străini, printre care menţionăm :

— T. N. Evreinova de la Universitatea „Lomonosov" din Moscova, care a prezentat în cadrul institutului cîteva aspecte ale cercetărilor în domeniul coacervatelor, efectuate sub conducerea acad. A. I. Oparin ;

— Prof. N. N. Diomin şi R. N. Etinhof de la Institutul de neurologie „I. P. Pavlov" din Leningrad ;

— A. A. Buianovskaia de la Prezidiul Academiei de Ştiinţe a U.R.S.S., secţia de ştiinţe biologice ;

— Prof. W. Kemula, din Varşovia ;

— Prof. Dr. I. Sechnovski şi prof. dr. F. Abgarowicz din Varşovia ;

— Prof. I. D. Popov de la Institutul pentru cultura plantelor din Sofia, care a făcut o expunere în cadrul institutului, asupra problemelor aflate în studiu în laboratorul său.

— Dr. J. Kůta şi dr. M. Heyrovsky de la Institutul de polarografie din Praga, care au ţinut în cadrul institutului şi al ASIT-ului conferinţa despre „Polarografia oscilografică" ;

— Doc. L. Ján din R.S. Cehoslovacă ;

— Prof. Felix Bergmann şi S. Bergmann de la Institutul de farmacologie al Universităţii Hadassah din Ierusalim ;

— José Bravo de la Universitatea din Havana, Cuba ;

— Prof. Dr. H. Tangl şi prof. dr. K. Baintner din Budapesta ;

— Delegaţia bulgară formată din K. Boev, L. Bonev, V. Kolarov, I. Baev şi S. Rabev de la Institutul de radiobiologie din Sofia.

În cursul acestui an au plecat, în cadrul unui schimb de experienţă, tov. cercetător S. Vasu în R. P. Bulgaria şi tov. cercetător V. Frunzeti în U.R.S.S.

A continuat activitatea Cercurilor de biochimie medicală şi biochimie generală.

Acad. E. Macovschi, care este şi preşedintele filialei S.R.S.C. a regiunii Bucureşti, a participat la diverse manifestări organizate pe această linie, iar o serie de cercetători ca : S. Vasu, V. Gheţie, H. D. Schell, M. Şerban, D. Tănăsescu, D. Moţet-Grigoraş, V. Frunzeti, C. Iordache, C. Medeşan au ţinut în capitală şi în regiunea Bucureşti conferinţe de popularizare.

Şi în acest an, Institutul de biochimie a expediat, la cerere, în străinătate, separatele unor lucrări efectuate în institut şi a primit, la cerere, separatele unor lucrări care interesau institutul.

Corina Iordache

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R., Bucureşti

Pentru a vă asigura o colecție completă și primirea la timp a revistei, reînnoiți abonamentul dv. pentru anul 1962.

ABONAMENTELE SE FAC LA OFICIILE POȘTALE, AGENȚIILE POȘTALE, FACTORII POȘTALI ȘI DIFUZORII VOLUNTARI DIN ÎNTREPRINDERI ȘI INSTITUȚII

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI R.P.R.

în anul 1961

BIOCHIMIE

ILIE VASILESCU, **Enzimele**, 429 p., 22,80 lei.

CHIMIE

T. NĂȘCUȚIU, **Cromatografia pe hîrtie a substanțelor anorganice**, 320 p. + 3 pl., 13,90 lei.
G. A. RĂDULESCU, **Proprietățile țițeiurilor românești**, 357 p. + 9 pl., 19,90 lei.
J. REICHEL, **Tehnologia coloranților antrachinonici**, 440 p. + 3 pl., 21,50 lei.

Din

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

au apărut:

Anul I, 1958, 4 n-re (a 5 lei);
anul II, 1959, 4 n-re (a 5 lei);
anul III, 1960, 4 n-re (a 5 lei);
anul IV, 1961, 4 n-re (a 5 lei).

Numerele curente se găsesc de vînzare la

LIBRĂRIA ACADEMIEI R.P.R.

Bucureşti, Calea Victoriei nr. 27, sau la orice librărie ştiinţifică din ţară.

Se pot comanda şi prin poştă la secţia „Cartea prin poştă" de pe lîngă Librăria Academiei R.P.R. sau la Librăria

„CARTEA PRIN POŞTĂ"

Bucureşti, str. Biserica Enei nr. 16, raionul 30 Decembrie

Abonamentele se fac la oficiile poştale, prin factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Pentru străinătate cererile de numere izolate sau de abonamente se fac prin întreprinderea de stat pentru comerţ exterior „Cartimex" I.S.C.E., str. Aristide Briand nr. 14, sau Căsuţa poştală 134–135, Bucureşti.

I. P. 2. c. 257

Lei 7.–

F 1330

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

2
ANUL V
1962

studii şi cercetări de biochimie

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

F 1330

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁR 1883

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

2

ANUL V

1962

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

COMITETUL DE REDACȚIE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI, *redactor responsabil*; ACADEMICIAN R. VLĂDESCU; D. ISĂCESCU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; S. OERIU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; E. SORU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; M. MEZINCESCU; H. SLUȘANSCHI, *redactor adjunct*; I. VASILESCU; V. ALEXANDRESCU, *secretar tehnic de redacție*.

REVISTA STUDII ȘI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

APARE DE 4 ORI PE AN

Redacția: BUCUREȘTI, str. Popovici nr. 20.
Telefon 18.43.55—17.79.63

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul V, nr. 2 1962

SUMAR

Pag.

F. ŠORM, Proteinele, structura şi funcţia lor 171

EUGEN MACOVSCHI, Unele perspective ale cercetării biochimice în domeniul hibridării vegetative a plantelor 193

EUGEN MACOVSCHI şi CORINA IORDACHE, Nivelul fosfagenului în diferite stări funcţionale ale muşchiului 207

O. COSTĂCHEL, M. FURNICĂ şi V. DRAGON, Formarea peroxizilor lipidici în ţesuturile şobolanilor iradiaţi şi radioprotejaţi 219

I. KIŢULESCU şi V. BĂLUŢĂ, Date biochimice în legătură cu semnificaţia activităţii catepsinelor din ţesuturile canceroase şi necanceroase 227

N. ANIŢIA, C. ILLE şi MARIA VOICULESCU, Variaţia nicotinei din foile de tutun, pe etaje, sub influenţa azotului din sol 235

GEORGETA ENĂCHESCU, Cîteva aspecte ale metabolismului acidului ascorbic la solanacee 245

M. FURNICĂ şi G. FURNICĂ, Studii biochimice asupra procesului de radioprotecţie 251

DITA COTARIU, Hidroliza triptică a proteinelor acvosolubile din creier . . . 263

NOTĂ DE LABORATOR

S. M. IDU, LUCIA COCIUMIAN şi VL. GEORGESCU, Reţinerea albastrului de bromfenol de către fracţiunile proteice serice în prezenţa unor fixatori . 271

RECENZII 277

CRONICA BIOCHIMIEI DIN R.P.R. 309

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOCHIMIE

ÉTUDES ET RECHERCHES DE BIOCHIMIE

Tome V, nº 2 1962

SOMMAIRE

Page

F. ŠORM, Les protéines, structure et fonction 171

EUGEN MACOVSCHI, New aspects of biochemical research in vegetative hybridization 193

EUGEN MACOVSCHI et CORINA IORDACHE, Taux du phosphagène aux différents états fonctionnels du muscle 207

O. COSTĂCHEL, M. FURNICĂ et V. DRAGON, Formation des peroxydes lipidiques dans les tissus des rats irradiés et radioprotégés 219

I. KIŢULESCU et V. BĂLUŢĂ, Données biochimiques sur la signification de l'activité des cathepsines des tissus cancéreux et non cancéreux 227

N. ANIŢIA, C. ILLE et MARIA VOICULESCU, La variation de la nicotine dans les feuilles de tabac, par étages, sous l'influence de l'azote du sol . . 235

GEORGETA ENĂCHESCU, Aspects du métabolisme de l'acide ascorbique chez les solanacées 245

M. FURNICĂ et G. FURNICĂ, Etude biochimique du processus de radioprotection 251

DITA COTARIU, Hydrolyse tryptique des protéines hydrosolubles du cerveau 263

NOTE DE LABORATOIRE

S. M. IDU, LUCIA COCIUMIAN et VL. GEORGESCU, Rétention du bleu de bromphénol par les fractions protéiques sériques en présence de fixateurs 271

COMPTES RENDUS 277

CRONIQUE DE LA BIOCHIMIE DANS LA R. P. ROUMAINE . . 309

ÉDITIONS DE L'ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE

АКАДЕМИЯ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

ТРУДЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ ПО БИОХИМИИ

Том V, № 2 1962

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

Ф. ШОРМ, Белки, строение и функция их 171
ЕУДЖЕН МАКОВСКИЙ, Некоторые перспективы биохимических исследований в области вегетативной гибридизации растений 193
ЕУДЖЕН МАКОВСКИЙ и КОРИНА ИОРДАКЕ, Содержание фосфагена при различных функциональных состояниях мышцы 207
О. КОСТЭКЕЛ, М. ФУРНИКЭ и В. ДРАГОН, Образование липидных перекисей в тканях облученных и радиозащищенных крыс 219
И. КИЦУЛЕСКУ и В. БЭЛУЦЭ, Биохимические данные, связанные с активностью катепсинов в раковых и нераковых тканях 227
Н. АНИЦИЯ, К. ИЛИЕ и МАРИЯ ВОЙКУЛЕСКУ, Изменение содержания никотина в листьях табака на различных уровнях под влиянием почвенного азота 235
ДЖЕОРДЖЕТА ЕНЭКЕСКУ, Некоторые особенности обмена аскорбиновой кислоты у пасленовых 245
М. ФУРНИКЭ и Г. ФУРНИКЭ, Биохимические исследования процессов радиозащиты 251
ДИТА КОТАРИУ, Триптический гидролиз водорастворимых белков мозга 263

ЛАБОРАТОРНАЯ ЗАМЕТКА

С. М. ИДУ, ЛУЧИА КОЧУМИАН и ВЛ. ДЖЕОРДЖЕСКУ, Сохранение синего бромфенола растворимыми белковыми фракциями в присутствии некоторых фиксаторов 271

РЕЦЕНЗИИ 277

ХРОНИКА БИОХИМИИ В РНР 309

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ

PROTEINELE, STRUCTURA ȘI FUNCȚIA LOR*)

de

ACADEMICIAN F. ȘORM

Știința, instrument puternic al omului pentru înțelegere și producerea de schimbări în natură și societate, ne oferă azi perspective cu adevărat uriașe. Realizările recente ale fizicii au pus în mîinile noastre surse inepuizabile de energie și au adus umanitatea în pragul erei atomice, cu posibilități enorme de utilizare a bogățiilor planetei noastre. Spațiile nemărginite și încă neexplorate ale universului se deschid înaintea geniului omului, înaintea muncii mîinilor sale. Urmărind uriașa dezvoltare a științei contemporane, care cercetează materia atît în structura elementară cît și în sisteme cosmice, trebuie să simțim cît este de important pentru viitorul nostru să obținem cît mai rapid posibil cunoștințe profunde despre noi înșine, despre viață și legile sale, despre natura vie ce ne înconjoară și cu care vom fi totdeauna legați inseparabil.

Viața, cu toată complexitatea sa de necrezut și varietatea sa fantastică, este fără îndoială stadiul cel mai înalt al dezvoltării materiei pe pămînt și se caracterizează prin trăsături calitativ noi, străine materiei nevii. Metabolismul, ereditatea cu perfecțiunea sa deosebită de transmitere a caracterelor biologice, capacitatea de adaptare la condițiile înconjurătoare și reacțiile orientate la stimulii externi și în sfîrșit, memoria, gîndirea și activitatea creatoare a omului — toate acestea sînt proprietăți exclusive ale vieții, determinate de evoluția în timp a materiei, în condiții specifice.

Baza materială a vieții și a tuturor manifestărilor sale este constituită de sistemul de compuși ce formează organisme vii și de transformările continue și complexe ale substanțelor și energiei ce determină

---

*) Această conferință a fost ținută la al V-lea Congres Internațional de Biochimie de la Moscova, 1961, în cadrul ședinței plenare.

Comitetul de redacție mulțumește academicianului F. Șorm pentru că a acceptat ca această conferință să fie publicată în limba romînă în revista noastră. Pergamon Press a fost de acord cu publicarea acestui articol în limba romînă. Traducerea a fost efectuată de Dita Cotariu de la Institutul de biochimie.

diferite reacţii chimice şi procese fizice. Proprietăţile calitativ noi ale materiei vii, mai precis, fenomenele biologice, sînt determinate de o imensă diversitate de complexe de fenomene chimice şi fizice individuale, de interdependenţa şi coordonarea lor complexă în timp.

Aceste concepţii generale asupra naturii şi funcţiei materiei vii au fost formulate pe baza unui material experimental bogat şi a unor ipoteze teoretice, în special în domeniul de cercetare al bazelor chimice ale fenomenelor biologice, mai precis, domeniul biochimiei, ramură a ştiinţei cu care se ocupă acest important Congres. Cercetarea chimică a materiei vii a dezvăluit treptat tabloul complex şi schimbător al compoziţiei şi structurii elementelor principale ale substanţei organice vii şi natura principalelor transformări chimice şi energetice ce apar în interiorul ei. Devine din ce în ce mai clară importanţa excepţională a sistemelor macromoleculare, baza esenţială a materiei vii — proteinele şi acizii nucleici — (deoarece funcţiile vitale de bază, metabolismul şi ereditatea, sînt legate cu aceste sisteme neobişnuit de complexe şi interdependente funcţional).

Calităţile deosebite ale proteinelor şi acizilor nucleici ca elemente de bază ale proceselor vitale au fost fără îndoială determinate de structura lor chimică. Ambele clase de compuşi sînt substanţe înalt polimerizate. Moleculele lor sînt construite pe baza unui principiu unitar dintr-un număr mare de părţi constitutive, identice pentru toate speciile de organisme. Însuşi acest detaliu este cea mai bună dovadă a unităţii tuturor animalelor pe pămînt şi a unei singure căi în dezvoltarea vieţii. Mai mult, sistemele de molecule mari, multicomponente, implică posibilitatea formării unui număr enorm, cu adevărat astronomic de combinaţii structurale, proprii compuşilor individuali, din care o fracţiune considerabilă este reprezentată în forma materiei vii de pe pămînt.

Multiplicitatea formelor manifestărilor vieţii este fără îndoială o reflectare a imensei diversităţi posibile în structurile proteinelor şi acizilor nucleici. Apariţia şi dezvoltarea vieţii au fost desigur determinate şi de alte trăsături ale structurii chimice a celor două sisteme : trăsături deja prezente în componentele elementare de bază ale structurilor lor şi trăsături inerente structurii spaţiale a propriilor lor molecule. Mă refer la natura amfoteră a părţilor constitutive ale proteinelor şi acizilor nucleici, precum şi natura hidrofobă sau hidrofilă a lanţurilor polipeptidice ale proteinelor. De fapt, macromoleculele proteice posedă forme spaţiale deosebite, cu o distribuţie specifică a sarcinilor cît şi a grupărilor hidrofile sau hidrofobe, ce dobîndesc într-un mediu apos, în care se dezvoltă viaţa, proprietăţi cu totul noi, înalt specializate şi diferite de acelea ale altor sisteme chimice.

De aceea, nu este surprinzător că proteinele şi acizii nucleici au atras recent atenţia cercetătorilor în multe domenii ale ştiinţei şi au constituit subiecte de cercetare sub toate aspectele. O problemă de importanţă fundamentală este încă elucidarea structurilor acestor două sisteme, constituţia lor intrinsecă, legătura lor cu legile dezvoltării biologice şi ceea ce este de cea mai mare importanţă, cu funcţiile specifice îndeplinite de proteine şi acizii nucleici în organismele vii.

La nivelul actual al cunoştinţelor şi tehnicii experimentale aceste probleme sînt rezolvabile numai într-o măsură limitată şi numai pentru cazul proteinelor. În momentul de faţă, concluzii precise, pe baze ştiinţifice, pot fi obţinute numai din cercetarea structurii proteinelor, nu şi a acizilor nucleici, deoarece avem la dispoziţia noastră proteine şi peptide superioare cu structuri moleculare definite şi activităţi biologice evidente. Examinarea structurii proteinelor este mai promiţătoare şi din punct de vedere metodologic, deoarece de obicei structura moleculelor polimere este cu atît mai accesibilă cercetărilor cu cît cuprinde mai multe părţi constitutive.

Voi trece acum la partea principală a expunerii mele.

Cred că va fi folositor ca în primul rînd să rezum stadiul actual al cunoştinţelor noastre asupra structurii chimice a proteinelor, apoi să prezint unele interpretări generale ale rezultatelor experimentale obţinute pînă acum şi, în sfîrşit, să demonstrez, referindu-mă la unele enzime şi hormoni polipeptidici sintetici, nivelul cunoştinţelor noastre asupra legăturii între structura chimică şi funcţiile biologice înalt specializate ale proteinelor.

Determinarea precisă a structurii chimice a proteinelor, ca şi a oricăror alţi compuşi, necesită în primul rînd alegerea unei substanţe individuale din punct de vedere chimic, o substanţă ale cărei molecule au structură identică. Aceste condiţii sînt în majoritatea cazurilor uşor realizabile pentru cazul compuşilor cu molecule mici, dar sînt extrem de greu de obţinut în cazul sistemelor macromoleculare naturale, deoarece acestea sînt în general prezente în amestecuri complexe, greu de separat. În afară de aceasta, dovedirea individualităţii moleculelor proteice întîmpină dificultăţi metodologice foarte mari. Structura spaţială a moleculelor proteice este determinată atît de structura primară, legăturile covalente între atomii individuali în lanţurile peptidice, cît şi de structura secundară şi terţiară, care determină fără îndoială proprietăţile specifice ale proteinelor. Din punct de vedere practic însă, în momentul de faţă noi cerem individualitate numai în structura primară a proteinelor, ca dovadă a microomogenităţii sau microheterogenităţii lor. Trebuie amintit în legătură cu aceasta că există în prezent mulţi aderenţi la teoria microheterogenităţii „obligatorii" a proteinelor. Reprezentanţii extremişti ai acestei teorii sugerează că moleculele oricărei proteine nu sînt individuale, ci constituie un sistem de compuşi, diferind mai mult sau mai puţin în ce priveşte compoziţia chimică, dar în special în aranjarea aminoacizilor în lanţurile peptidice. S-a sugerat şi posibilitatea că numai unele regiuni structurale ale proteinelor şi anume acelea purtătoare ale funcţiilor biologice, au structură specifică, şi că compoziţia în aminoacizi şi aranjarea lor constantă nu este obligatorie în alte părţi „mai puţin importante" ale lanţurilor peptidice. Trebuie să fie de la început clar pentru toţi că nu se poate face cu succes o analiză a proteinelor, avînd la bază ipoteza heterogenităţii „obligatorii" a moleculelor lor. Din fericire, toate rezultatele obţinute pînă acum în investigaţiile asupra structurii polipeptidelor naturale şi ale moleculelor proteice mici, dovedesc în mod convingător că cel puţin proteinele cu activitate biologică sînt microomogene şi chimic individuale, după criteriile chimiei clasice.

O explicație completă a structurii proteinelor individuale din punct de vedere chimic este o sarcină extrem de grea dacă se ia în considerare dimensiunea moleculelor lor. Există în prezent două căi de acces ale acestei probleme, deși numai pentru proteine cu molecule mici. Una, ce poate fi denumită metoda chimică, a fost stabilită de F. Sanger atunci cînd a determinat structura insulinei, și a dus mai tîrziu la explicarea deplină a structurii primare a ribonucleazei de către C. H. Hirs, S. Moore și N. H. Stein. Calea cealaltă, reprezentată în special de școala lui Kendrew și Peruzzi, se bazează pe analiza structurală radiologică a proteinelor. Un succes răsunător obținut prin astfel de investigații, a fost stabilirea structurii secundare a mioglobinei. Avantajul acestei metode este că servește de asemenea la determinarea structurii spațiale a moleculei proteice, în timp ce metoda chimică de descompunere a proteinelor permite numai obținerea de informații asupra structurii lor primare. Trebuie menționat însă că ambele metode sînt încă foarte laborioase și necesită o cheltuială de timp foarte mare. Un neajuns al metodei chimice este marele număr de operații de separare și analitice la care trebuie supuse fragmentele structurale obținute prin scindarea proteinei. În același timp, cînd proteinele sînt cercetate prin metode fizice, interpretarea rezultatelor obținute este dificilă și de altfel uneori arată contradicții considerabile. Totuși, cele două căi de acces la cercetarea structurii proteice pot fi utilizate pentru completare reciprocă și e de așteptat ca în viitor, din combinarea lor reușită, să apară o metodă nouă, mai perfectă, de analiză structurală a substanțelor cu molecule mari. Nu este nici o îndoială că, chiar metodele noastre actuale pot fi perfecționate, prima în special prin mecanizarea și automatizarea cercetărilor experimentale utilizînd mașinile de calculat pentru determinarea structurii fragmentelor peptidice ale proteinei, iar ultima prin perfecționarea tehnicii experimentale și a metodelor de prelucrare a rezultatelor. Idealul, care s-ar putea atinge prin progresul opticii undelor scurte către limita teoretică a puterii de separare, este desigur observarea optică directă a structurii compușilor cu molecule mari.

Este foarte probabil că explicarea deplină a structurii proteice va fi încă și pe viitor o operație laborioasă și costisitoare, accesibilă numai unor laboratoare specializate. Ar fi de aceea bine dacă astfel de laboratoare ar putea încheia cît de curînd posibil o înțelegere internațională asupra subiectelor de cercetare, pentru a evita efectuarea aceluiași lucru de două ori și a asigura rezultate maxime pentru dezvoltarea cu succes a științei mondiale. Organizarea unui simpozion asupra structurii proteinelor va fi folositoare ca prim pas pentru traducerea în fapt a acestei idei.

Stabilirea completă sau parțială a structurii cîtorva polipeptide naturale sau chiar proteine, constituie numai o realizare foarte modestă a științei, avînd în vedere varietatea imensă a vieții și a sistemelor sale macromoleculare. Cu toate acestea, chiar aceste investigații pot fi surse de informație valoroasă dacă acceptăm concepția biologică că structura chimică a proteinelor (și de asemenea a acizilor nucleici) este o reflectare a procesului de dezvoltare evolutivă a speciilor și a dezvoltării ontogenetice a indivizilor. Dacă se admite că această concepție este corectă, se poate

postula că structura chimică a sistemelor macromoleculare nu este întîmplătoare (aşa cum s-ar putea presupune din punct de vedere pur matematic) ci este supusă unor legi definite, deşi foarte complexe, şi incomplet explicate [1].

Cea mai valoroasă dovadă a acestei concepţii este oferită de elucidarea completă a structurilor insulinei şi hormonilor peptidici (corticotropina, hormonul melanotrop, hipertensina, oxitocina, vasopresina etc.) [2], din ţesuturile diferitelor specii animale şi de asemenea de binecunoscutele descoperiri ale lui H. Tuppy [21] asupra secvenţei aminoacizilor în „hemopeptide", peptide combinate cu hemul, obţinute din hidrolizate parţiale de citocrom C de diferite surse. Aceste cercetări au arătat că structura primară a proteinelor sau peptidelor cu aceeaşi funcţie biologică era în multe privinţe asemănătoare la cele mai diferite specii. Compararea moleculei mici de peptide izolate din hidrolizatele parţiale ale unor proteine cu molecule mari, sugerează că e de aşteptat să se găsească relaţii structurale similare şi la proteine cu funcţii biologice mai puţin evidente. Aceste descoperiri servesc ca o dovadă în plus pentru existenţa unei căi unice de dezvoltare a vieţii pe pămînt şi demonstrează de asemenea că în cursul acestei dezvoltări a existat o diferenţiere treptată a funcţiilor legate de structuri specifice macromoleculare. În cursul evoluţiei ulterioare au avut loc numai schimbări mai puţin semnificative ale acestor structuri. Compararea structurii unor proteine şi peptide cu funcţii asemănătoare oferă informaţii valoroase despre locul unde trebuie căutate schemele generale care în cursul filogeniei au reglat dezvoltarea structurală a proteinelor şi mecanismul biosintezei lor. În această privinţă, merită atenţie părţile lanţurilor peptidice din proteinele diferitelor organisme, ce diferă unele faţă de altele.

Tabela 1

Deosebiri în succesiunea aminoacizilor din proteinele tisulare de diferite animale

Insulină, lanţ A

Speciile animale	Nr. resturilor aminoacid		
	8	9	10
Bou	Ala.	Ser.	Ileu.
Porc	Tr.	Ser.	Ileu.
Cal	Tr.	Gli.	Ileu.
Oaie	Ala.	Gli.	Val.
Balenă	Tr.	Ser.	Ileu.

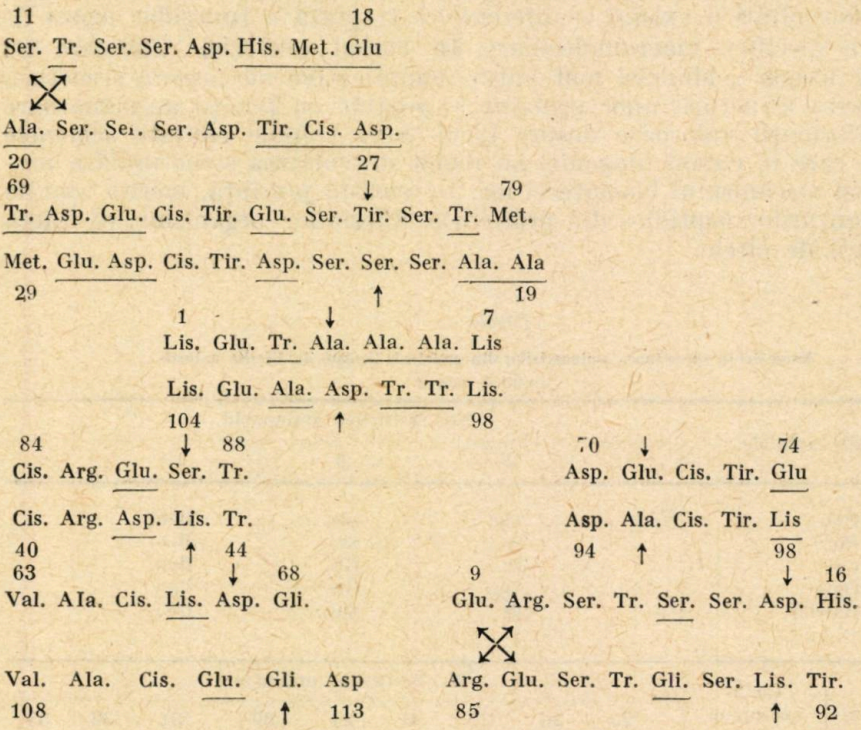
Specia animalului	Corti-cotropina	Nr. resturilor aminoacid								
		25	26	27	28	29	30	31	32	33
Bou		Asp.	Gli.	Glu	Ala.	Gli	Asp	Ser.	Ala.	Glu
Porc	A	Gli.	Ala.	Glu	Asp.	Asp.	Glu	Leu.	Ala.	Glu
Porc	β—	Asp.	Gli.	Ala	Glu.	Asp.	$GluNH_2$	Leu	Ala.	Glu
Oaie	α—	Ala.	Gli.	Glu	Asp.	Asp.	Glu	Ala.	Ser.	Glu

Examinarea tabelei 1 dezvăluie scheme deosebit de evidente în secvența aminoacizilor la hormonii diferitelor specii animale. Aceste scheme constau în mare măsură din înlocuirea unor aminoacizi cu alții strîns înrudiți din punct de vedere structural și biogenetic sau din transpozițiile caracteristice ale aminoacizilor învecinați sau apropiați.

Este foarte probabil că aceste scheme sînt legate de fenomene mai generale în procesul de filogenie [3]. Corectitudinea acestor opinii este sprijinită de remarcabilele cercetări ale lui V. M. Ingram [4] asupra diferențelor între structura hemoglobinei umane normale (hemoglobina A) și forma patologică de hemoglobină, hemoglobina „seceră" (hemoglobina S). Aceste proteine se deosebesc prin aceea că acidul glutamic este înlocuit cu valină în două din cele patru lanțuri peptidice ale hemoglobinei în cazul anemiei cu hematii falciforme. Este foarte probabil că această diferență este de origine genetică, adică este legată de schimbări în structura acizilor dezoxiribonucleici și nucleici ai reticulocitelor.

Schema 1

Analogii între fragmentele peptidice ale ribonucleazei (grupările amidice din molecula ribonucleazei sînt omise)



Notă. La schema 1 și la cele următoare săgețile verticale arată perechi de aminoacizi neidentici și care nu se pot schimba între ei sau aminoacizi izolați. Resturile de aminoacizi ce formează perechi ce se pot schimba între ele sînt subliniate. Săgețile încrucișate leagă aminoacizi ce se pot schimba între ei — identici sau formînd perechi. Liniile care leagă diferite resturi aminoacid reprezintă regiuni cu asemănare structurală.

Voi arăta acum, cum aceste scheme de înlocuire şi transpoziţie a aminoacizilor în anumite părţi ale lanţurilor peptidice ale proteinelor pot fi folosite pentru compararea structurilor proteice deja cunoscute [3]. Fără îndoială, pentru cercetarea relaţiilor structurale interne, ribonucleaza este materialul cel mai adecvat.

Schema 1 arată că de obicei interschimburile au loc între glicocol şi serină, alanină şi treonină, acid aspartic şi acid glutamic, valină şi leucină şi, în afară de acestea, între cisteină şi serină, cisteină şi metionină, histidină şi tirozină şi de asemenea acid glutamic şi lizină. Astfel de interschimburi par a avea un caracter mai general. Relaţiile structurale între perechile de aminoacizi enumerate sînt evidente la prima vedere. O excepţie este acidul glutamic şi lizina. Cu toate acestea, chiar şi în acest caz există un grad foarte mare de asemănare în ce priveşte structura chimică a lizinei şi glutaminei; în procesul biosintezei proteice glutamina este aptă de a fi direct inclusă în lanţul polipeptidic. În ciuda faptului că aceste interschimburi de aminoacizi reprezintă numai o mică fracţiune din perechile de aminoacizi teoretic posibile (8 din 289) sau mai puţin de 3%, acceptarea lor duce la stabilirea unei asemănări surprinzătoare între structura fragmentelor peptidice superioare ale ribonucleazei, în special cînd se compară ordinea aminoacizilor în ambele direcţii. În schema 1 se arată că părţi considerabile ale lanţurilor peptidice ale ribonucleazei se repetă în alte locuri ale lanţului peptidic într-o formă regulat schimbată. Aceste fenomene nu pot fi întîmplătoare, ci sînt expresia unei scheme bine determinate în structura primară a enzimei. Există o analogie izbitoare între ordinea aminoacizilor în segmentul 69—79 şi ordinea inversată a resturilor aminoacid în secvenţa 29—19, unde interschimbul acid aspartic-acid glutamic apare în trei puncte. De asemenea, există o analogie interesantă la capetele acestor fragmente : resturile 29 şi 79 sînt metionină, restul 69 treonină, iar restul 19 este alanină. Aşa cum s-a mai menţionat, perechea alanină-treonină face parte dintre aminoacizii ce se pot schimba între ei. Este de remarcat că la unele fragmente peptidice asemănătoare ale ribonucleazei există perechi de aminoacizi care nu sînt nici identici nici nu se pot schimba între ei, conform regulilor stabilite. Se poate presupune că astfel de perechi, care sînt în schemă indicate prin săgeţi, au o importanţă hotărîtoare în formarea secvenţei aminoacizilor în timpul biosintezei enzimei. S-ar putea ca ele să îndeplinească funcţia unui semnal informativ bine determinat, aşa cum se întîmplă în cibernetică.

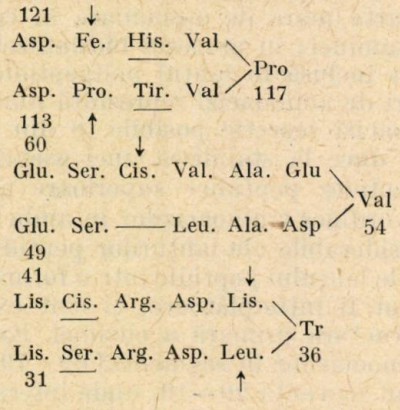
În unele cazuri, asemănarea structurală între fragmentele peptidice ale ribonucleazei este mai puţin evidentă la prima vedere, deoarece există transpoziţii de perechi de aminoacizi identice sau ce se pot schimba între ele, fie de acizi învecinaţi sau acizi în poziţia 1,3. Trebuie acordată atenţie şi analogiei oarecum complexe dintre structurile fragmentelor heptapeptidice în segmentele 55—61 şi 62—68, care sînt legate direct (grupările amidice la aceste fragmente sînt omise)

55						61
Glu.	Ala.	Val.	Cis.	Ser.	Glu.	Lis
Asp.	Val.	Ala.	Cis.	Lis.	Asp.	Gli
62						68

Examinarea mai amănunțită a lanțului polipeptidic al ribonucleazei va dezvălui o anumită simetrie în structura unor segmente, în sensul că, începînd de la unul (sau doi) aminoacizi, există secvențe similare de aminoacizi identici sau care se pot schimba între ei, mergînd în ambele direcții, așa cum este ilustrat în schema 2. Se poate observa de asemenea în aceste segmente ale lanțurilor polipeptidice ale ribonucleazei prezența unor perechi de aminoacizi care nu sînt identici, nici foarte înrudiți ca structură, și a unor acizi încorporați izolat (așa cum se indică prin săgeți în schemă). S-ar putea ca acești aminoacizi să joace rolul de semnale informative.

Schema 2

Aranjări simetrice în unele lanțuri peptidice ale ribonucleazei (grupările amidice din molecula ribonucleazei sînt omise)



În schema 3 se arată întreaga structură a ribonucleazei. Regiunile unde s-au observat unele scheme regulate — analogii ale fragmentelor peptidice sau aranjări simetrice — sînt subliniate. După cum se vede, astfel de scheme regulate există în cea mai mare parte a moleculei.

Analogii structurale de același tip ca la ribonuclează, pot fi demonstrate și la alte proteine, deși adesea nu sînt așa de clare și nu se extind la fracțiuni atît de mari ale lanțurilor lor peptidice. Dacă examinăm structura de mult cunoscută a insulinei [8] (privind acizii ce formează fiecare din următoarele șase perechi ca posibil de a fi schimbați între ei: glicocol-serină, glicocol-alanină, leucină-izoleucină, leucină-valină, acid glutamic-acid aspartic și histidină-tirozină), se pot dovedi la ambele lanțuri peptidice ale insulinei, fragmente mari ce se repetă cu secvența resturilor aminoacid regulat schimbată (schema 4).

Un fapt remarcabil este că regiuni cu structură asemănătoare sînt distribuite pe întreaga lungime a lanțului A, în timp ce în lanțul B acestea se găsesc numai în partea (segmentele 2—21) corespunzătoare lanțului A, ca număr de aminoacizi. Partea lanțului B conținînd resturile aminoacid de la 22 la 30 nu prezintă fragmente analoage cu acelea ale lațului A sau ale părții restante a lanțului B. Trebuie menționat că partea terminală a lanțului B al insulinei conține doi aminoacizi bazici, arginina și lizina. O schemă interesantă există la fragmentele peptidice conținînd resturile 10—16 în lanțul A și 16—21 în lanțul B. Grupele dipeptidice tir.leu.

sau leu.tir. sînt aranjate simetric în părţile opuse ale tripeptidului val. cis.ser. sau peptidul analog construit val.cis.gli. Acest fenomen este întîlnit adesea în structurile diferitelor proteine.

Analogia în structura lanţurilor peptidice, ilustrată în schema 5, pentru un peptid conţinut de glucagon [9] poate fi urmărită de asemenea şi la alte proteine sau peptide naturale.

Schema 3

Structura ribonucleazei (regiunile cu analogie structurală sînt subliniate)

Lis.	Glu.	Tr.	Ala.	Ala.	Ala.	Lis.	Fe.	Glu.	Arg.	Ser.	Tr.	Ser.	Ser.	$AspNH_2$.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

His.	Met.	Glu.	Ala.	Ala.	Ser.	Ser.	Ser.	$AspNH_2$.	Tir.	Cis.	$AspNH_2$.	$GluNH_2$.	Met.	Met.
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30

Lis.	Ser.	Arg.	Asp NH_2.	Leu.	Tr.	Lis.	Asp.	Arg.	Cis.	Lis.	Pro.	Val.	Asp NH_2.	Tr.
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45

Fe.	Val.	His.	Glu.	Ser.	Leu.	Ala.	Asp.	Val.	Glu.NH_2.	Ala.	Val.	Cis.	Ser.	Glu NH_2.
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60

Lis.	$AspNH_2$.	Val.	Ala.	Cis.	Lis.	$AspNH_2$.	Gli.	Tr.	$AspNH_2$	$GluNH_2$.	Cis.	Tir.	$GluNH_2$.	Ser.
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75

Tir.	Ser.	Tr.	Met.	Ser.	Ileu.	Tr.	Asp.	Cis.	Arg.	Glu.	Ser.	Tr.	Gli.	Ser.
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90

Lis.	Tir.	Pro.	$AspNH_2$.	Ala.	Cis.	Tir.	Lis.	Tr.	Tr.	$AspNH_2$.	Ala.	$GluNH_2$.	Lis.	His.
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105

Ileu.	Ileu.	Val.	Ala.	Cis.	Glu.	Gli.	$AspNH_2$.	Pro.	Tir.	Val.	Pro.	Val.	His.
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119

Fe.	Asp.	Ala.	Ser.	Val.
120	121	122	123	124

Schema 4

Relaţii structurale interne la insulină (resturile de aminoacizi însemnate prin numere cu apostrof aparţin lanţului B, celelalte, lanţului A. Grupările amidice din molecula insulinei sînt omise)

Tripeptide analoage

7′	9′	10′	12′	2	4	3	5
Cis.	Gli. Ser.	His.	Leu. Val	Ileu.	Val. Glu	Val.	Glu. Glu.
Cis.	Ala. Ser.	Tir.	Leu. Val	Leu.	Val. Glu	Leu.	Glu. Asp.
7	9	16′	18′	11′	13′	16	18

Analogii între fracțiuni peptidice superioare

16 20
Leu. Glu. Asp. Tir — — — — — — — — Cis

10 15
Val. Asp. Glu. His. Leu. Cis Val. Cis. Ser. (Leu. Tir). Glu

2′ ↑ 7′ (Tir. Leu) Val. Cis. Gli. Glu
16′ 20′ 16′ 20′ 21′
Tir. Leu. Val. Cis. Gli ↓ 19
His. Leu. — — — — Glu. Asp. Tir
5′ 16 Leu
Cis. Gli Glu. — — — — — Tir 14
8′

Elemente analoage între lanțurile A și B ale insulinei

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
H.Gli. Ileu. Val, Glu. Glu. Cis. Cis. Ala. Ser. Val. Cis. Ser.

Leu. Tir. Glu. Leu. Glu. Asp. Tir. Cis. Asp. OH

13 14 15 16 17 18 19 20 21

Lanț A

1′ 2′ 3′ 4′ 5′ 6′ 7′ 8′ 9′ 10′ 11′ 12′ 13′
H. Fe. Val. Asp. Glu. His. Leu. Cis. Gli. Ser. His. Leu. Val. Glu.

Ala. Leu. Tir. Leu. Val. Cis. Glí. Glu. Arg. Gli. Fe. Fe. Tir. Tr.

14′ 15′ 16′ 17′ 18′ 19′ 20′ 21′ 22′ 23′ 24′ 25′ 26′ 27′

Pro. Lis. Ala. OH
28′ 29′ 30′

Lanț B

Schema 5

Elemente analoage în structura unui peptid superior conținut de glucagon (gruparea amidică a restului acid glutamic este omisă)

11
Tr. Ser. Asp. Tir. Ser
Fe
6
Tr. Gli. Glu. Ser. His
1

Un exemplu izbitor în această privință este oferit prin compararea structurilor hormonilor peptidici hipofizari. Moleculele unora dintre acești hormoni formați în lobul anterior al glandei, și anume hormonii cortico-

tropi şi α- şi β- melanotropi ai porcului, conţin fragmente relativ mari cu structură similară. Dacă este acceptat principiul interschimbului de aminoacizi mai sus menţionat, se poate dovedi o asemănare structurală între moleculele hormonilor elaboraţi de lobul posterior al hipofizei, anume oxitocina şi vasopresina şi hormonul lobului anterior, corticotropina, în ciuda faptului că cele două grupe de hormoni sînt produse de sisteme de celule destul de diferite [3]. La prima vedere structura primilor doi compuşi diferă net de structura corticotropinei (schema 6). Dar asemănarea lor devine evidentă cînd se compară tripeptidele ce intră în compoziţia lor, cu condiţia ca să se accepte înlocuirea unui aminoacid, conform principiului menţionat mai sus.

Schema 6

Analogii între structurile oxitocinei, vasopresinei şi corticotropinei

Oxitocina — Cis. Tir. Ileu. $GluNH_2$ $AspNH_2$. Cis. Pro. Leu. $Gli(NH_2)$ (S—S)

Vasopresina (porc) — Cis. Tir. Fe. $GluNH_2$. $AspNH_2$. Cis. Pro. Lis. $Gli(NH_2)$ (S—S)

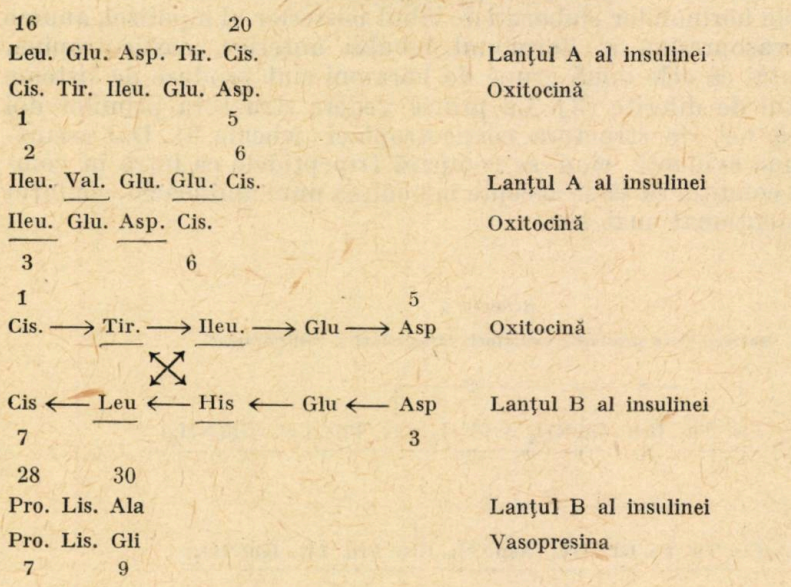
Corticotropina — H. Ser. Tir. Ser. Met. Glu. His. Fe. Arg. Tri. Gli. Lis. Pro. Val. Gli. Lis. Lis. Arg. Arg. Pro. Val. Lis. Val. Tir. Pro. Asp. Gli. Glu. Ala. Glu. Asp. Ser. Ala. Glu. Ala. Fe. Pro. Leu. Glu. Fe. OH

În schema 6 se arată că există grupe de dipeptide analoage, cis. tir. sau ser.tir. la începutul acestor trei lanţuri. Există de asemenea o grupare similară şi la începutul lanţului altui hormon peptidic, α- melanotropina de porc, a cărui structură este arătată în schema 11, (vezi mai jos). Al treilea aminoacid din primul tripeptid este diferit la trei din cei patru hormoni luaţi în discuţie, aşa încît este posibil ca această parte a lanţului să aibe o semnificaţie specială. Următoarea secvenţă tripeptidică a oxitocinei şi vasopresinei $gluNH_2$. $aspNH_2$.cis. este analoagă cu gruparea glu. asp.ser. situată în segmentul 29—31 al lanţului peptidic al corticotropinei de porc. Trebuie amintit că segmentul 10—12 al corticotropinelor şi α-melanotropinei de porc conţine gruparea gli.lis.pro., în care resturile aminoacid sînt o secvenţă opusă aceleia a celui de al treilea tripeptid al vasopresinei, pro.lis.gli. Fragmentul peptidic gli.lis.pro. formează un pentapeptid cu gruparea val.gli. a corticotropinei. Un punct interesant este că molecula corticotropinei nu conţine cisteină, în timp ce aceasta este prezentă în cantitate destul de mare — 2 resturi din 9 — la oxitocină şi vasopresină. Aceşti hormoni însă, nu conţin serină.

Este de menţionat că ordinea primilor cinci aminoacizi la oxitocină, prezintă o analogie bine definită cu lanţul A al insulinei (schema 7).

Schema 7

Analogii structurale ale oxitocinei și vasopresinei cu aceea a insulinei
(grupările amidice sînt omise)



Așa cum s-a arătat mai înainte, grupările tripeptidice par să joace în general un rol important în analogiile structurale ale proteinelor.

Dacă se compară structura insulinei, hormon elaborat de pancreas, cu structura ribonucleazei, se găsesc cinci tripeptide identice și șapte tripeptide cu structuri analoage (cînd se acceptă interschimbul pentru trei perechi de aminoacizi, glicocol-serină, valină-leucină și acid aspartic-acid glutamic), dintre care la cinci dintre ele, resturile aminoacid sînt aranjate în ordine directă, iar la două în ordine inversată (schema 8).

Schema 8

Comparație între structura insulinei și ribonucleazei
(grupările amidice sînt omise; resturile aminoacid însemnate prin numere cu apostrof aparțin lanțului B al insulinei, celelalte lanțului A)

Tripeptide identice

Ala. Ser. Val. Val. Cis. Ser. Val. Glu. Ala. Asp. Tir. Cis. Tir. Asp. Asp.

Tripeptide cu structuri analoage

Asp. Cis. Tir. Val. Cis. Gli. Glu. Glu. Cis. Glu. Arg. Gli. Glu. Ala. Leu.

Glu. Cis. Tir. Val. Cis. Ser. Asp. Glu. Cis. Glu. Arg. Ser. Glu. Ala. Val.

Tripeptide cu structuri analoage în ordine inversată

Leu. Ala. Gli — Glu. Ala. Leu

Leu. Ala. Asp — Glu. His. Val

Analogii ale structurilor peptidice superioare (peptidele de sus aparțin insulinei, cele de jos ribonucleazei)

2′ 6′
Val. Asp. Glu. His. Leu

Leu. Ser. Glu. His. Val
51 47

15′ 12′
Leu. Ala. Glu. Val

Val. Glu. Ala. Leu
12′ 15′

Leu. Ala. Asp. Val. Glu. Ala. Val
51 57

8 12 18 21
Ala. Ser. Val. Cis. Ser — Asp. Tir. Cis. Asp.

17 21
Glu. Asp. Tir. Cis. Asp

Glu. Ala. Val. Cis. Ser — Asp. Tir. Cis. Asp.

Asp. Glu. Cis. Tir. Glu
55 59 24 27 70 74

18′ 22′ 21′ 24′
Val. Cis. Gli. Glu. Arg — Glu. Arg. Gli. Fe

Val. Cis. Ser. Glu. Lis — Fe. Glu. Arg. Ser
57 61 8 11

8 10
Ala. Ser. Val — Tripeptide din insulină diferind la diverse animale

Ala. Ser. Val — Tripeptide terminale ale ribonucleazei
122 124

1 S——S
(H). Gli. Isoleu. Val. Glu. $GluNH_2$. Cis. Cis. Ala. Ser. Val. Cis. Ser

21
Leu. Tir. $GluNH_2$.Leu. Glu. $AspNH_2$. Tir. Cis. $AspNH_2$ (OH)

Lanțul A al insulinei

1
(H)Fe. Val. $AspNH_2$. $GluNH_2$. His. Leu. Cis. Gli. Ser. His. Leu.
Val. Glu. Ala. Leu. Tir. Leu. Val. Cis. Gli. Gli. Glu. Arg. Gli. Fe.

30
Fe. Tir. Tr. Pro. Lis. Ala (OH)

Lanțul B al insulinei

Fragmentele peptidice cu structuri apropiate de structura peptidelor ribonucleazei, constituie la ambele lanțuri ale insulinei nu mai puțin de 57% din întregul lanț peptidic, așa cum se va vedea din structura insulinei dată mai jos, și în care sînt subliniate peptidele insulinei ce se aseamănă cu cele ale ribonucleazei.

Comparînd în acest fel structura glucagonului și a ribonucleazei, s-a constatat că 52% din lanțul polipeptidic al glucagonului are o structură similară cu aceea a ribonucleazei (schema 9). Se dă mai jos structura glucagonului la care sînt subliniate fragmentele peptidice analoage cu peptidele ribonucleazei.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
(H).	His.	Ser.	GluNH_2.	Gli.	Tr.	Fe.	Tr.	Ser.	Asp.	Tir.	Ser.	Lis.

13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Tir.	Leu.	Asp.	Ser.	Arg.	Arg.	Ala.	Glu.NH_2.	Asp.	Fe.	Val.	GluNH_2.

25	26	27	28	29
Tir.	Leu.	Met.	AspNH_2.	Tr(OH)

Este interesant de notat că fragmentele asemănătoare ca structură cu peptidele ribonucleazei se găsesc numai într-o jumătate a moleculei de glucagon, partea 1—16, în timp ce în cealaltă jumătate nu există astfel de fragmente analoage.

Schema 9

Comparație între structurile glucagonului și ribonucleazei
(Grupările amidice sînt omise)

Tripeptide identice

Ser. Asp. Tir — Ser. Lis. Tir

Tripeptide cu structuri analoage (tripeptidele de sus aparțin glucagonului, cele de jos ribonucleazei)

Ser. Asp. Tir — Ser. Glu. Gli — Glu. Gli. Tr

Ser. Asp. His — Cis. Glu. Gli — Asp. Gli. Tr

Tripeptide cu structuri analoage, în ordine inversată

Tr. → Ser. Asp — Tir. → Ser. Lis — His. → Ser. Glu

Tr. Ser. Glu ← — Tir. Ser. Glu ← — Tir. Ser. Glu ←

Analogii între structuri peptidice superioare

8 → 11 Ser. Asp. Tir. Ser

Ser. Asp. Tir. Cis

23 → 26

11 → 15 Ser. Lis. Tir. Leu. Asp

Ser. Lis. Tir. Pro. Asp

90 → 94

10 → 13 Tir. Ser. Lis. Tir

Tir. Ser. Glu. Tir

76 ← 73

Prima parte a moleculei de glucagon este foarte asemănătoare ca structură cu ribonucleaza, în timp ce a doua diferă net de aceasta.

Comparînd structurile tuturor hormonilor menţionaţi, am presupus că se puteau schimba între ei aminoacizi formînd numai 11 perechi. Aceşti aminoacizi constituie mai puţin de 4% din numărul teoretic posibil de perechi de aminoacizi conţinute în molecule. Este destul de probabil că posibilitatea interschimbului de aminoacizi nu a fost constantă, ci variabilă în funcţie de modul în care proteinele, în compoziţia cărora s-au găsit aceşti aminoacizi, au apărut în procesul de evoluţie.

Numărul insuficient de observaţii face imposibilă găsirea unei definiţii general aplicabilă asupra relaţiilor structurale la moleculele proteice menţionate mai sus. În afară de aspectul evolutiv general, se poate considera că există un mecanism specific de sinteză a proteinei, ce nu este constant, aşa cum s-a sugerat pînă acum. Factorul dinamic al procesului este împotriva concepţiilor existente că sinteza proteică ar fi o reproducere după un tipar prestabilit şi invariabil. Chiar şi după o astfel de concepţie, biosinteza proteinelor dirijată de către semnale informative, ar putea avea loc destul de economic într-un tipar ce suferă schimbări în părţi relativ mici ale structurii sale.

Trecem acum la partea următoare a prezentării noastre. Relaţia dintre structură şi funcţie în moleculele proteinelor şi peptidelor se observă cel mai bine la substanţe cu activitate biologică bine definită şi parametri moleculari pe cît posibil mici. Unele enzime (de exemplu ribonucleaza) dar în special hormonii peptidici, satisfac aceste cerinţe. Avantajul acestui ultim grup de compuşi, este că structurile chimice ale celor mai mulţi dintre ei sînt în prezent precis cunoscute şi unii au fost de acum sintetizaţi, în timp ce structurile altor tipuri de enzime sînt necunoscute. Totuşi, în ciuda acestui fapt, unele proprietăţi generale ale enzimelor şi mai ales prezenţa în moleculele lor a centrilor activi ce determină funcţii specifice ale enzimelor, ne dau posibilitatea să obţinem informaţii valoroase asupra relaţiilor dintre structura şi funcţia biologică a acestor substanţe.

O trăsătură caracteristică a enzimelor şi în special a enzimelor digestive, este aceea că sînt elaborate de către celulă în forme catalitic inactive — zimogene — ce sînt ulterior activate. În unele cazuri, modul de activare al zimogenelor este complet lămurit. S-a găsit că, în general, activarea zimogenelor constă din ruperea din molecula lor a unei grupări, sub acţiunea unei enzime proteolitice, avînd ca rezultat eliberarea centrului activ al enzimei. Lucrările asupra activării enzimelor sînt bine cunoscute, de aceea nu vom insista asupra lor în amănunţime.

Cercetarea structurilor centrilor activi este o direcţie foarte promiţătoare în munca de elucidare a relaţiilor dintre structura enzimei şi funcţia lor. Abordarea experimentală a acestei probleme a fost posibilă prin descoperirea inactivării specifice a enzimelor prin reacţia moleculelor lor cu derivaţi activi ai diesterilor acidului fosforic. Unul sau cîteva resturi a unuia sau altuia dintre diesterii acidului fosforic era combinat prin radical etil cu grupările hidroxil ale resturilor serină ce forma nucleul centrului activ al enzimei. Aceasta poate prezenta avantaj pentru izolarea şi identificarea fragmentelor peptidice dispuse în jurul centrului activ al

enzimei. Enzima inactivată este scindată de către protează cu formare de peptide fosforilate. Rezultatele experimentale obținute au arătat în mod surprinzător că centrii activi ai unei serii întregi de enzime aveau o structură foarte asemănătoare (tabela 2).

Tabela 2

Centrii activi ai unor enzime

Enzima	Centrul activ
Chimotripsină [a]	Gli.Asp.$\overset{+}{\text{S}}$er.Gli.Gli.Pro.Leu
Tripsină [b]	Gli.Gli.Asp.$\overset{+}{\text{S}}$er.Gli.Pro.Val.Cis
Trombină [c]	Gli. Asp.$\overset{+}{\text{S}}$er.Gli
Fosfoglucomutaza [d]	Asp.$\overset{+}{\text{S}}$er.Gli.Glu.Ala.Val
Aliesterază hepatică de cal [e]	Gli.Glu.$\overset{+}{\text{S}}$er.Ala.Gli.Gli.(Glu,Ser)
Pseudocolinesterază [f]	Fe.Gli.Glu.$\overset{+}{\text{S}}$er.Ala.(Ala ^{2},Ser)
Elastază (inhibată DPP) [g]	Gli.Asp.$\overset{+}{\text{S}}$er.Gli

[a] R. A. Oosterbaan et al., Biochim. Acta, **27**, 556 (1957).
[b] G. H. Dixon et al., J. Biol. Chem., **233**, 1373 (1958).
[c] I. A. Gladner, K. Laki, J. Am. Chem. Soc., **80**, 1263 (1958).
[d] D. E. Koshland, M. J. Erwin, J. Am. Chem. Soc., **79**, 2657 (1957).
[e] H. S. Jansz, C. H. Posthumno, J. A. Cohen, Biochim. Biophys. Acta, **33**, 396 (1959).
[f] H. S. Jansz, P. Brons, M. G. P. J. Warringa, Biochim. Biophys. Acta, **34**, 573 (1959).
[g] M. A. Naughton et al., Biochem. J., **77**, 1149 (1960).

Astfel, centrii activi ai chimotripsinei, tripsinei și trombinei conțineau grupări tetrapeptidice identice și s-au găsit chiar aranjări identice a cinci aminoacizi la aliesteraza hepatică de cal și la pseudocolinesterază. Reîntîlnim aici posibilitatea interschimbului de aminoacizi, într-un caz interschimbul obișnuit acid glutamic-acid aspartic, în alt caz interschimbul mai puțin obișnuit glicocol-alanină.

Toate enzimele enumerate în tabela 2 sînt hidrolaze, ceea ce explică ușor asemănarea mecanismelor lor de acțiune. Specificitatea acestor enzime este aparentă, prin urmare determinată de diferențe în structura primară a restului moleculei sau de specificitatea structurii secundare sau terțiare, adică prin structura topochimică generală a moleculelor lor. În legătură cu aceasta, am atrage atenția asupra cercetărilor noastre anterioare în care am examinat procesul de inactivare a chimotripsinei prin dinitrofenolizarea foarte atentă a resturilor ei de lizină [10]. S-a observat cu această ocazie o micșorare a diferitelor activități enzimatice ale chimotripsinei. Atunci cînd patru resturi lizină ale chimotripsinei erau înlocuite prin grupări dinitrofenol, capacitatea ei de coagulare a laptelui practic dispărea; activitatea ei protează era micșorată cu două treimi dar activitatea esterazică rămînea practic neschimbată. Un punct interesant era că atunci cînd se înlocuiau două resturi lizină, aceasta antrenînd micșorarea considerabilă a activităților de coagulare și protează, activi-

tatea esterazică a chimotripsinei creştea (cu 20%). Cînd se înlocuiau şapte resturi lizină, toate activităţile enzimatice ale chimotripsinei erau mult reduse, totuşi, capacitatea ei de a sintetiza din aminoacizi peptide conţinînd metionină, creştea considerabil (cu 30%).

S-a demonstrat ulterior, de mai mulţi autori, că vătămarea chiar profundă a structurii enzimei nu-i reducea activitatea. Pe de altă parte, în unele cazuri, schimbări relativ uşoare, implicînd probabil centrul activ al enzimei, duceau la inactivare rapidă. Înlocuirea treptată a grupărilor reactive hidrofile în catenele laterale ale resturilor de aminoacizi ale enzimei, ducea la micşorarea treptată a activităţii ei. O schimbare în natura sarcinii acestor grupări suprima activitatea enzimei, invers proporţional cu severitatea intervenţiei. Acilarea grupărilor amino şi hidroxil ducea la reducerea treptată a activităţii, pe cînd guanidarea resturilor de lizină nu micşora în majoritatea cazurilor activitatea enzimatică. În această privinţă, sînt interesante rezultatele obţinute de W. A. Klee şi F. M. Richards [11] care au demonstrat că activitatea enzimatică a ribonucleazei rămînea neschimbată atunci cînd se guanidau resturile lizină 9, 3 şi 10, pe cînd guanidarea tuturor celor 10 resturi de lizină ducea la inactivarea completă a ribonucleazei.

Trebuie acordată atenţie experienţelor care demonstrează efectul pe care îl exercită asupra activităţii unei enzime scindarea treptată a unor lanţuri peptidice de diferite lungimi. Este bine cunoscut faptul că scindarea moleculei de pepsină duce la formarea unor fragmente cu activitate enzimatică, dar aceste fragmente nu au fost încă izolate în stare pură şi identificate. După T. Viswanatha şi alţii [12] din tripsină pot fi izolate fragmente enzimatic active, eventual chiar cu specificitatea schimbată. Greutatea moleculară a fragmentului activ izolat din acestea era aproximativ 5 000—6 500. În acelaşi mod, R. L. Hill şi E. L. Smith [13] au reuşit să scindeze din molecula de papaină cu ajutorul leucinaminopeptidazei, o mare parte a lanţului peptidic (120 aminoacizi) şi să obţină un peptid activ constituit din 60 resturi aminoacizi. Dimpotrivă, activitatea ribonucleazei era rapid micşorată chiar printr-o scindare uşoară a terminaţiei ei carboxilice de către carboxipeptidază. F. M. Richards [14] a scindat ribonucleaza cu subtilizină în două părţi, dintre care cea mai mică conţinea 20 resturi aminoacizi. Fiecare parte a enzimei era inactivă separat, dar amestecul celor două prezenta activitate ribonucleazică.

Toate aceste rezultate arată că centrul activ este de însemnătate fundamentală pentru dezvoltarea activităţii enzimatice, dar că manifestarea completă a activităţii şi în special activitatea specifică a enzimelor depinde de alte porţiuni ale structurii lor primare sau secundare. Este pe deplin evident că cercetările experimentale îndreptate spre izolarea şi identificarea produşilor activi rezultaţi din scindarea enzimelor prezintă o importanţă deosebită. Este extrem de probabil că în urma unor astfel de cercetări, va deveni posibilă sinteza sistemelor cu activităţi enzimatice, ceea ce constituie un lucru de mare importanţă practică.

Hormonii peptidici, sînt fără îndoială, compuşii cei mai adecvaţi pentru un studiu exact al relaţiei dintre structura chimică şi activitatea biologică. Multe dintre aceste substanţe au fost deja sintetizate şi aceasta

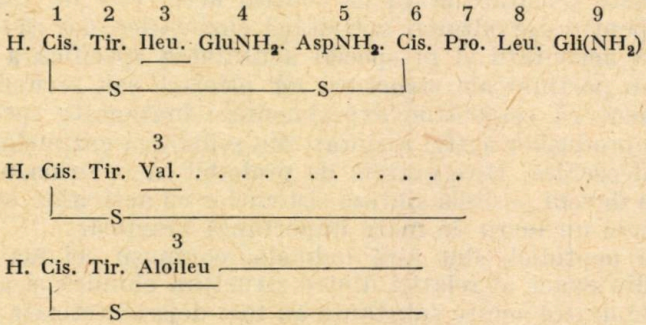
a deschis drumul pentru sinteza analogilor cu structuri specific modificate. Trebuie să ne amintim că avem de afăcut cu substanțe cu o înaltă activitate și că activitatea biologică a analogilor lor sintetici va depinde nu numai de structură dar și de alți factori, cum este permeabilitatea membranei celulare. Mai mult, este posibil de a produce un număr uriaș de derivați chiar pentru cei mai simpli compuși de acest fel, ca de exemplu oxitocina și vasopresina, și aceasta a dus la o abordare empirică sau semiempirică a problemei.

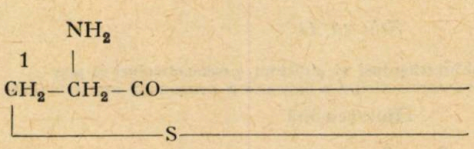
Este desigur imposibil de a trece în revistă în această expunere toate rezultatele cercetărilor din acest domeniu. De aceea ne ocupăm numai de concluziile la care s-a ajuns și acestea indică faptul că în majoritatea cazurilor chiar schimbări mici ale moleculelor acestor doi hormoni, de exemplu înlocuirea unui aminoacid cu altul foarte asemănător ca structură, duce la micșorarea considerabilă a activității biologice, dar nu în toate cazurile, și nu pînă la completa suprimare. De asemenea, diferite schimbări topochimice în structura moleculară au efecte foarte diferite asupra activității biologice a unei anumite substanțe. Unele fenomene sînt deosebit de importante. Trebuie menționată descoperirea recentă de către V. Du Vigneaud și alții [15] a unui analog al oxitocinei în care primul rest cisteină este înlocuit cu acid ß-mercaptopropionic (schema 10). Activitatea acestui analog era chiar mai mare decît aceea a oxitocinei însăși. În același timp, rezultatele cercetărilor noastre au arătat că un analog al oxitocinei în care se află D-cisteina în poziția 1, era complet inactiv [16]. Un lucru de foarte mare interes a fost descoperirea în laboratoarele noastre, a unui analog al oxitocinei cu activitate foarte mare, în care izoleucina în poziția 3 era înlocuită cu valină (înlocuire descrisă anterior ca prezumptivă). Totuși, înlocuirea izoleucinei cu aloizoleucină ducea la reducerea activității hormonale. Un analog al vasopresinei cu lizina din poziția 8 înlocuită prin acid 2,4-diaminobutiric (schema 10) avea o activitate biologică foarte mare.

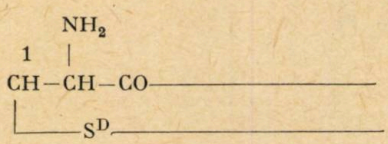
Schema 10

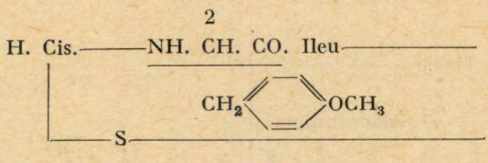
Analogi structurali ai oxitocinei și vasopresinei

Oxitocină

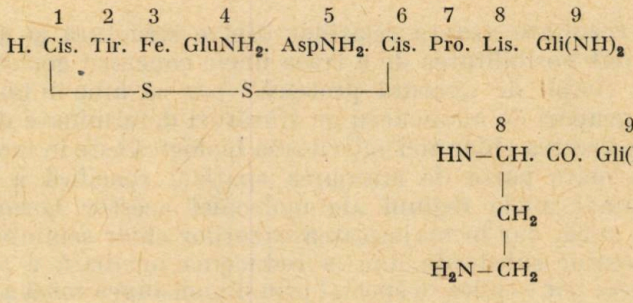








Vasopresină (porc)



În cazul analogilor sintetici ai hipertensinei, această imagine era oarecum diferită. Prezenţa în lanţurile peptidice ale acestui hormon a unor aminoacizi, nu părea să aibă importanţă esenţială pentru manifestarea activităţii biologice. Înlocuirea acidului aspartic al hipertensinei cu alţi aminoacizi (schema 11) nu avea un efect apreciabil asupra activităţii sale. Chiar poziţia 2 nu era foarte importantă, deoarece înlocuirea argininei prin lizină, ornitină sau nitroarginină ducea la compuşi destul de activi [18], [19]. Înlocuirea valinei cu leucină în poziţia 3 dădea o substanţă aproape complet activă, în timp ce înlocuirea analoagă în poziţia 5 ducea la pierderea activităţii, deşi un derivat natural al hipertensinei cu izoleucină în poziţia 5 este destul de activ [19].

Relaţii similare s-au observat şi la melanotropine în care unitatea structurală esenţială pentru activitate era pentapeptidul his.fe.arg.tr. gli., şi care cu toate acestea el însuşi avea doar o slabă activitate biologică. Prelungirea lanţului în ambele direcţii (schema 11) ducea la o creştere treptată a activităţii [20]. Un fenomen similar s-a observat şi cu β-corticotropina, scindarea parţială a moleculei sale de la capătul carboxilic nereuşind să ducă la pierderea activităţii.

Schema 11

Analogi structurali ai hipertensinei și structura α-melanotropinei de porc
(fragmentul peptidic esențial pentru activitatea biologică a hormonului este subliniat)

Hipertensină

1	2	3	4	5	6	7	8
Asp.	Arg.	Val.	Tir.	Val.	His.	Pro.	Fe

3
——Leu——

5
——Leu——

5
——Isoleu——

α-Melanotropină

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ac——	Ser.	Tir.	Ser.	Met.	Glu.	His.	Fe.	Arg.	Tr.	Gli.	Lis.	Pro.	Val(NH_2)

Diferitele rezultate asupra relațiilor dintre structură și activitatea biologică ne-au dat posibilitatea de a trasa unele concluzii generale. Chiar compuși relativ simpli de „natură proteică" par să aibe în lanțurile lor peptidice unele grupări de aminoacizi cu trăsături determinate de „centrii activi". Cu toate acestea chiar aici activitatea biologică este în mod aparent determinată, în mare parte de aranjarea spațială specifică a moleculei hormonului. Numai unele regiuni ale moleculei acestor hormoni au o importanță mai mică, dar în majoritatea cazurilor chiar schimbări ușoare în structura acestor substanțe duc la reducerea imediată a activității. Aceste fenomene se pot explica în special prin dimensiunea mică a moleculei hormonilor peptidici. Este de asemenea necesar de a se lua în considerare întregul complex de fenomene care influențează determinarea activității lor.

Lucrările asupra sintezei hormonilor peptidici și a analogilor lor au luat o dezvoltare foarte mare și au dus la multe realizări teoretice și practice. Totuși se simte de acum necesitatea unei dezvoltări a cercetărilor către obținerea de noi date asupra relațiilor între structura și funcția biologică a substanțelor cercetate. Acest fel de concepție trebuie să se bazeze în special pe studii mai profunde de biosinteză și de scindare naturală a hormonilor peptidici și pe elucidarea mecanismelor lor de acțiune. Am vrea să menționăm cîteva din cercetările noastre recente, bazate pe studiul mecanismului de inactivare a oxitocinei de către oxitocinază, care au dus la descoperirea inhibitorilor activi ai acestei enzime. Cercetările lui H. Tuppy [21] cît și cercetările noastre [22] au arătat că oxitocinaza serurilor de animale gravide scinda hormonul între restul cisteină din poziția 1 și restul tirozină din poziția 2. Și alte țesuturi sînt capabile de a scinda oxitocina, dar mecanismul acestui proces nu este încă exact cunoscut. În laboratoarele noastre s-a arătat că unele peptide foarte simple, de exemplu fragmentele oxitocinei obținute sintetic, erau inhibitori

puternici ai acestui proces, *in vitro*, ele intrînd probabil în competiţie cu oxitocina în rolul de substrat [23]. Aceste rezultate au deschis noi posibilităţi pentru cercetarea modului de acţiune a oxitocinei, dezvăluind semnificaţia biologică a secvenţei primilor doi aminoacizi din lanţul său peptidic. Într-adevăr, modificarea acestei părţi a moleculei oxitocinei şi vasopresinei ducea la analogi interesanţi, printre care, în afara substanţelor menţionate cu acid β-mercaptopropionic şi D-cisteină în poziţia 1, un derivat al oxitocinei cu grupare metil, legată de gruparea hidroxil a tirozinei în poziţia 2 (schema 10). Conform rezultatelor noastre [2], acest compus are un efect puternic de inhibare a acţiunii oxitocinei, iar după V. Du Vigneaud este şi un inhibitor al vasopresinei. Această sinteză reuşită subliniază posibilitatea de a sintetiza hormoni cu activitate biologică parţială, ca şi substanţe cu acţiune antihormonală.

Schema 12

Inhibitori ai oxitocinazei

Cis. Tir. OH
|
S_{Bz}

Cis. Tir. NH_2
|
S_{Bz}

$GluNH_2$. $AspNH_2$. Cis. Pro. Leu. $Gli(NH_2)$
|
S_{Bz}

Cis. Pro. Leu. $Gli(NH_2)$
|
S_{Bz}

Ala. Tir. Ileu. $GluNH_2$. $AspNH_2$. Ala. Pro. Leu. $Gli(NH_2)$

Cis. Tir. Ileu. $GluNH_2$. $AspNH_2$. Cis. Pro. Leu. $Gli(NH_2)$
| |
S_{Bz} S_{Bz}

Oxitocină

Cis. Tir. Ileu. $GluNH_2$. $AspNH_2$. Cis. Pro. Leu. $Gli(NH_2)$
└——S——————S——┘

Voi trece acum la concluzia expunerii mele. Proteinele, structura lor chimică, relaţiile lor cu schemele de dezvoltare ale materiei vii şi legăturile lor cu funcţiile biologice, sînt probleme ce stau astăzi în faţa ştiinţei naturii în eforturile sale de a înţelege formele superioare ale existenţei materiei pe pămînt. Am încercat să dovedesc în această lucrare

că aceste probleme nu sînt infinit de complexe și insolubile, așa cum ar fi de așteptat după concepțiile pur mecaniciste asupra variației structurale a polimerilor naturali foarte complecși. Ele sînt supuse, desigur, unor legi generale ce pot fi studiate, înțelese și cu adevărat stăpînite. Nu este nici o îndoială că studiul mai avansat al proteinelor și acizilor nucleici, al structurii lor, biosintezei și modului interacțiunii lor funcționale, în special explicarea ulterioară a rezultatelor obținute va duce într-un viitor nu prea îndepărtat, la descoperiri fundamentale cu caracter revoluționar, descoperiri ce vor da omului posibilitatea de a controla dezvoltarea materiei vii și de a schimba în adevăratul sens al cuvîntului, viața omenească.

Institutul de chimie organică și biochimie
al Academiei cehoslovace de științe, Praga

BIBLIOGRAFIE

1. F. ŠORM, Collection of Czechoslov. Chem. Commun., **19**, 1003 (1954).
2. F. ŠORM, B. KEIL, J. VANĚČEK, V. TOMÁSEK, O. MIKEŠ, B. MELOUN, V. KOSTKA, V. HOLEYŠOVSKÝ, *Date asupra structurii proteinelor.* Collection of Czechoslov. Chem. Commun., **26**, 531 (1961).
3. F. ŠORM, Collection of Czechoslov. Chem. Commun., **24**, 3169 (1959).
4. V. M. INGRAM, Biochim. et Biophys. Acta, **16**, 599 (1955); J. A. HUNT, V. M. INGRAM, Nature, **181**, 1062 (1958); V. M. INGRAM, Nature, **180**, 326 (1957).
5. C. H. HIRS, S. MOORE, W. H. STEIN, J. Biol. Chem., **235**, 633 (1960). D.H. SPACKMAN, W. H. STEIN, S. MOORE, J. Biol. Chem., **235**, 648 (1960).
6. F. ŠORM, B. KEIL, Collection of Czechoslov. Chem. Commun., **23**, 1575 (1958).
7. F. ŠORM, Collection of Czechoslov. Chem. Commun., **26** (1961) sub tipar.
8. F. SANGER, H. TUPPY, Biochem. J., **49**, 463 (1951); F. SANGER, H. TUPPY, Biochem. J., **49**, 481 (1951).
9. W. W. BROMER et al., J. Amer. Chem. Soc., **79**, 2798, 2801, 2805 (1957).
10. I. RYCHLIK, F. ŠORM, Collection of Czechoslov. Chem. Commun., **19**, 162 (1954).
11. W. A. KLEE, F. M. RICHARDS, J. Biol. Chem., **229**, 489 (1957).
12. T. VISWANATHA, I. E. LIENER, Bioch m. et Biophys. Acta, **37**, 389 (1960).
13. R. L. HILL, E. L. SMITH, J. Biol. Chem., **231**, 117 (1958).
14. F. M. RICHARDS, Proc. Natl. Acad. Sci., **44**, 162 (1958); F. M. RICHARDS, P. J. VITHAYTHIL, J. Biol. Chem., **234**, 1459 (1959).
15. V. DU VIGNEAUD, G. WINESTOCK, V. V. S. MURTI, D. B. HOPE, R. D. KIMBROUGH Jr ., J. Biol. Chem., **235**, PC64 (1960).
16. M. ZAORAL, K. JOŠT, F. ŠORM, J. RUDINGER, *Al XVII-lea Congres internațional de chimie pură și aplicată*, München, 1959; K. JOŠT, J. RUDINGER, F. ŠORM, Collection of Czechoslov. Chem. Commun., 26 (1961) sub tipar.
17. M. ZAORAL, K. JOŠT, F. ŠORM, J. RUDINGER, *Al XVII-lea Congres internațional de chimie pură și aplicată*, München, 1959.
18. R. SCHWYZER, M. SCHACHTER, *Polypeptides which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels.* Pergamon Press, 1960, 152.
19. R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL, H. ZUBER, Chimia, **11**, 335 (1957).
20. K. HOFMANN, M. E. WOOLNER, G. SPUHLER, E. T. SCHWARTZ, J. Amer. Chem. Soc., **80**, 1486 (1958); R. SCHWYZER, CHOH HAO LI, Nature, **182**, 1669 (1958).
21. H. TUPPY, H. NESVADBA, Monatsh. Chem., **88** 977 (1957).
22. Z. BERÁNKOVÁ, I. RYCHLÍK, F. ŠORM, Experientia, **15**, 298 (1959); Z. BERÁNKOVÁ, I. RYCHLÍK, F. ŠORM, Collection of Czechoslov. Chem. Commun., **25**, 2575 (1960).
23. Z. BERÁNKOVÁ, I. RYCHLÍK, F. ŠORM, Collection of Czechoslov. Chem. Commun., **26** (1961) sub tipar.
24. M. ZAORAL, K. JOŠT, F. ŠORM, J. RUDINGER, *Al XVII-lea Congres internațional de chimie pură și aplicată*, München, 1959; K. JOŠT, J. RUDINGER, F. ŠORM, Collection of Czechoslov. Chem. Commun., **26** (1961) sub tipar. H. D. LAW, V. DU VIGNEAUD, J. Amer. Chem. Soc., **82**, 4579 (1960).

UNELE PERSPECTIVE ALE CERCETĂRII BIOCHIMICE ÎN DOMENIUL HIBRIDĂRII VEGETATIVE A PLANTELOR*)

DE

ACADEMICIAN EUGEN MACOVSCHI

De mult se cunoaşte faptul că în anumite împrejurări, altoirea poate duce la schimbări profunde în natura plantelor şi că noile caractere dobîndite se pot transmite plantelor din generaţiile următoare. Totodată, s-a constatat că plantele noi, obţinute pe această cale asexuată, vegetativă, prezintă asemănări atît de evidente cu hibrizii obţinuţi prin încrucişări sexuate, încît prin analogie, li s-a dat şi lor denumirea de hibrizi, şi anume de hibrizi vegetativi.

Problema hibridării vegetative a plantelor prin altoiri prezintă un interes teoretic şi practic cu totul deosebit, deoarece investigaţiile în acest domeniu aduc contribuţii esenţiale atît la explicarea eredităţii, cît şi la lămurirea naturii procesului fecundaţiei, care stă la baza hibridării sexuate. Într-adevăr, prin astfel de cercetări se deschide calea spre descoperirea mecanismului prin care diferiţi factori intervin în procesul moştenirii din generaţie în generaţie a caracterelor ereditare, şi spre stabilirea posibilităţilor de dirijare tot mai eficientă a naturii plantelor prin intermediul procesului de reproducere. Aplicate în agricultură, aceste investigaţii duc la obţinerea plantelor din ce în ce mai corespunzătoare, dotate cu însuşiri biologice din ce în ce mai valoroase şi cu productivitatea cantitativ şi calitativ din ce în ce mai bună.

Este evident că modul cum se atacă toate aceste probleme atît de importante pentru biologie în general şi agricultură în special, depinde în primul rînd de natura concepţiilor care stau la baza investigaţiilor teoretice şi experimentale respective. Or, în domeniul hibridării plantelor prin altoire, s-au conturat pînă acum două concepţii opuse, una a geneticii formale iar cealaltă a geneticii miciuriniste.

Conform primei dintre aceste concepţii, elaborată de şcoala weissmanist-morganistă, caracterele ereditare ale plantelor sînt condiţionate

*) Comunicare prezentată la Sesiunea ştiinţifică jubiliară organizată cu ocazia sărbătoririi centenarului Grădinii Botanice din Bucureşti în octombrie 1961.

de anumiți factori ereditari numiți „gene", deosebiți ca origine și însușiri de toate celelalte substanțe care se găsesc în organism. Factorii ereditari, genele, ar fi localizați în cromozomi și s-ar transmite din generație în generație numai prin cromozomii celulelor sexuale care participă la procesul fecundației. Cum schimbul de cromozomi dintre organisme poate avea loc numai în cadrul înmulțirii sexuate și în nici un caz nu este realizabil prin altoire, adepții geneticii formale neagă cu desăvîrșire posibilitatea obținerii și existenței hibrizilor vegetativi și susțin că hibrizii pot fi obținuți numai pe cale sexuată. După ei, părțile altoite ale plantelor, adică altoiul și portaltoiul, conviețuiesc independent una de alta, fiecare păstrînd integral autonomia sa biologică, iar metabolismul și relațiile lui cu mediul nu ar avea nici un rol în procesul condiționării și transmiterii caracterelor ereditare. Faptul că prin altoire se pot obține totuși plante cu caractere și însușiri noi, modificate, este explicat de adepții geneticii formale ca datorit fie unor erori de tehnică, fie formării unor himere, adică a unor organisme vegetale anormale, compuse din țesuturi de proveniență diferită, fie unor mutații.

Cu totul alta este poziția miciuriniștilor privitor la înțelegerea eredității. Conform învățăturii miciuriniste, caracterele ereditare sînt condiționate de specificul metabolismului fiecărui organism în raport cu condițiile mediului în care acesta trăiește. Înmulțirea sexuată se realizează prin asimilarea reciprocă a gameților, ceea ce poate duce, în cazul gameților provenind din organisme de natură diferită, la apariția ființelor cu un fel nou de metabolism, adică la hribrizi sexuați. În mod asemănător, prin asimilarea substanțelor elaborate de partener, altoiul și portaltoiul își pot modifica reciproc felul de metabolism, ceea ce poate duce la apariția hibrizilor vegetativi. Astfel, după adepții geneticii miciuriniste, hibrizii pot fi obținuți atît pe cale sexuată cît și pe cale vegetativă, prin altoiri, iar esența procesului care duce la formarea celor două feluri de hibrizi este principial aceeași, și constă în elaborarea unui nou fel de metabolism corelat cu condițiile mediului în care trăiește și se dezvoltă noul hibrid. Învățătura miciurinistă neagă existența unei substanțe ereditare speciale, independentă de toate celelalte substanțe din organism și transmisibilă numai prin cromozomi în cadrul înmulțirii sexuate. Nereușita anumitor încercări de obținere a hibrizilor vegetativi prin altoire se explică fie prin alegerea necorespunzătoare a materialului biologic supus experimentării, fie prin nerespectarea principiilor, condițiilor și regulilor de lucru stabilite de învățătura miciurinistă în domeniul hibridării vegetative a plantelor.

Lupta dintre genetica formală și genetica miciurinistă în domeniul hibridării plantelor, reprezintă de fapt lupta între idealism și materialism, iar adepții celor două genetici menționate ajung adesea la dispute și polemici vehemente. Spre exemplificare, se pot menționa dezbaterile ce au avut loc la sesiunea a IV-a a Academiei de Științe Agricole „V. I. Lenin", în august 1948, pe baza raportului prezentat de T. D. Lîsenko [1], respectiv articolul „Analiza cîtorva rezultate negative ale experiențelor de hibridare vegetativă" de N. I. Feighinson apărut atît în revista „Botaniceskii jurnal" din 1960, cît și în Analele romîno-sovietice din 1961 [2].

Concepțiile cu privire la procesul hibridării, și prin urmare la posibilitatea sau imposibilitatea obținerii hibrizilor vegetativi ai plantelor, exercită influență covîrșitoare nu numai asupra felului și conținutului cercetărilor biologice, dar și asupra tuturor celorlalte aspecte ale cercetării științifice în acest domeniu, inclusiv asupra cercetărilor biochimice.

Biochimistul situat pe pozițiile geneticii formale, admite că „genele" aflate în cromozomi sînt singurii factori hotărîtori și imuabili ai procesului transmiterii caracterelor ereditare și că hibridarea poate fi realizată numai prin intermediul procesului sexual. După convingerea lui, metabolismul plantelor și condițiile de mediu nu au nimic comun nici cu ereditatea în general și nici cu hibridarea sexuată în special, iar hibridarea vegetativă a plantelor nici nu este de conceput. În consecință, el își îndreaptă cercetările spre cunoașterea genelor cuprinse în cromozomi, precum și spre elucidarea relațiilor dintre aceste gene și însușirile biochimice, fiziologice și biologice ale plantelor, convins că numai în felul acesta poate să ajungă la lămurirea mecanismului transmiterii caracterelor ereditare de la o generație de plante la alta și la cunoașterea mecanismului modificării acestor caractere în condițiile hibridării sexuate. În cadrul studiilor și investigațiilor sale el nu se preocupă de problema cercetării metabolismului plantelor cu care lucrează și nici nu pune problema relațiilor dintre metabolism, condițiile mediului și însușirile organismului vegetal, fiindcă astfel de cercetări nu se încadrează în concepția sa despre ereditate, și de aceea i se par inutile. Cu atît mai mult, el nu întreprinde cercetări în problema hibridării vegetative a plantelor, deoarece după convingerea lui, o astfel de problemă nici nu se poate pune.

Altfel procedează biochimistul care se plasează pe pozițiile geneticii miciuriniste. Pentru el, factorul esențial care intervine în procesul transmiterii caracterelor ereditare și condiționează natura biologică specifică a plantei este metabolismul corelat cu condițiile mediului. De aceea, el își axează investigațiile sale în primul rînd pe cercetarea aprofundată a metabolismului, precum și a factorilor care îl pot modifica. Desigur, el nu exclude din investigațiile sale compușii care se găsesc în nucleul celular și în cromozomi, dar îi cercetează prin prisma metabolismului, știind că metabolismul plantei este acela care duce la formarea acestor compuși și că acțiunea lor asupra organismului vegetal se realizează tot pe calea metabolismului.

Acesta este conținutul general al cercetării biochimice în domeniul hibridării vegetative a plantelor, avînd în vedere cele două orientări generale opuse, cu privire la esența hibridării însăși. Conturarea direcțiilor principale ale cercetării biochimice în acest domeniu, precum și stabilirea felului acestor cercetări, necesită însă luarea în considerație a concepțiilor fundamentale elaborate de marii biologi materialiști Ch. Darwin, I. V. Miciurin și alții.

Ch. Darwin a fost unul dintre primii oameni de știință care a recunoscut posibilitatea obținerii hibrizilor vegetativi prin altoire [3] și a căutat să fundamenteze teoretic formarea acestor hibrizi, admițînd că „anumite elemente care contribuie la formarea unei ființe noi se formează nu numai în organele sexuale mascule și femele, ci și în cele mai diferite țesuturi ale

organismului, și de aceea se pot uni și fără concursul organelor sexuale, dînd muguri noi, capabili să moștenească caracterele ambelor forme părintești" [4]. Deși Ch. Darwin nu a dat precizări cu privire la natura acestor elemente, totuși a ajuns la convingerea că cercetările în domeniul hibridării vegetative a plantelor „mai devreme sau mai tîrziu vor modifica concepțiile fiziologilor cu privire la înmulțirea sexuată" [5].

Principiile darwiniste în domeniul hibridării vegetative a plantelor prin altoire au fost susținute de K. A. Timireazev [6], iar cercetători ca L. Burbank [7], L. Daniel [8], I. E. Gluşcenko [9] și alții, prin lucrările lor experimentale au adus contribuții însemnate în sprijinul acestor principii și au ajuns la unele concluzii interesante cu privire la participarea hranei în procesul transformării plantelor. L. Burbank a formulat chiar o ipoteză despre modul de intervenție a sucurilor vegetale în hibridarea vegetativă.

O etapă importantă în dezvoltarea cercetărilor în domeniul hibridării vegetative a plantelor prin altoiri a fost inaugurată de I. V. Miciurin, care pornind de la concepția că altoiul și portaltoiul se influențează reciproc prin schimb de substanțe nutritive produse de fiecare în parte, a preconizat metoda mentorului care permite dirijarea procesului de hrănire a componenților altoiți și asigură obținerea hibrizilor vegetativi. Prin aceasta a fost întărită convingerea că hrana este aceea care joacă rolul decisiv în formarea hibrizilor vegetativi [10].

Ideile lui I. V. Miciurin cu privire la rolul esențial al hranei în formarea hibrizilor vegetativi au fost dezvoltate ulterior de T. D. Lîsenko după care esența fenomenului de hibridare vegetativă prin altoire constă în modificarea metabolismului unei plante sub acțiunea substanțelor plastice elaborate de altă plantă parteneră la altoire [11].

Din cele expuse pînă aici rezultă că de pe pozițiile geneticii miciuriniste se desprind două concluzii importante pentru cercetări biochimice în domeniul hibridării vegetative a plantelor.

Prima concluzie poate fi formulată în modul următor : dacă altoirea duce la un schimb reciproc de substanțe plastice nutritive dintre altoi și portaltoi, și dacă aceste substanțe prin asimilare pot modifica metabolismul partenerilor altoiți, înseamnă că altoirea poate provoca schimbări mai mult sau mai puțin profunde ale însușirilor și proceselor biochimice atît la altoi, cît și la portaltoi. Numeroase cercetări confirmă justețea acestei concluzii. Spre exemplificare, putem menționa că la floarea-soarelui, pe care s-a altoit topinambur, A. I. Ermakov [12] a constatat creșterea conținutului în vitamina C și în pigmenți carotinoidici ; G. S. Ilin [13] a dovedit că în tomate, mătrăgună și alte plante din familia *Solanaceae* care nu produc nicotina, apare acest alcaloid în cazul altoirii pe tutun și că în tomatele altoite pe *Nicotiana glauca*, care produce nornicotina, apare nicotina ; B. A. Rubin și N. M. Sisakian [14] au demonstrat că altoirea în coroana unui măr stadial bătrîn a lăstarului unui puiet hibrid, face ca în frunzele acestuia din urmă activitatea peroxidazei să crească dacă portaltoiul este un măr tîrziu și să scadă în cazul portaltoiului timpuriu ; activitatea invertazei din frunzele altoiului menționat se modifică în sens invers ; N. M. Sisakian, I. E. Gluşcenko și N. V. Vasilieva [15] lucrînd pe tomate,

au constatat că modificările unor indici biochimici ca activitatea peroxidazică, echilibrul dintre sinteza și hidroliza zaharozei etc. survenite în urma hibridării vegetative, se transmit generațiilor următoare, ceea ce arată că noile caractere cîștigate pe cale vegetativă se moștenesc, adică devin ereditare. Alte investigații de acest gen sînt menționate în cartea *Biochimia metabolismului* publicată de N. M. Sisakian [16], în articolul *Starea și perspectivele cercetării influenței reciproce dintre altoi și portaltoi la plante* de A. S. Krujilin [17], precum și în diferite articole și culegeri monografice.

Toate aceste lucrări, tind să răspundă la întrebarea : „Ce se produce în plante în urma hibridării ?". Toate au scopul comun de a stabili ce anume modificări biochimice sînt provocate prin altoire și hibridare vegetativă atît la plantele altoite, cît și la descendenții lor, în vederea descoperirii legilor după care noile caractere dobîndite se transmit și se fixează la descendenți.

A doua concluzie care se desprinde din aceleași considerații, este următoarea : dacă, conform concepției miciuriniste, hibridarea vegetativă la plante altoite se realizează datorită schimbului reciproc de sucuri dintre altoi și portaltoi, înseamnă că tratarea unor plante cu sucurile sau extractele plantelor de altă natură, ar putea provoca la plantele tratate efecte asemănătoare celor care se produc prin altoiri și care ar putea duce la obținerea unor hibrizi vegetativi. Astfel de idei au fost formulate de unii cercetători ca G. H. Molotkovski [18], [19], O. B. Lepeșinskaia [20] și alții.

Și în acest domeniu, literatura cuprinde lucrări care vin în sprijinul concluziei amintite. Așa de pildă, M. I. Școlnik și N. A. Makarova [21] au înmuiat semințele și apoi au stropit plantele de grîu *Diamant milturum* cu extractele semințelor și frunzelor de grîu ramificat ; plantele tratate au devenit mai bogate în glucide decît plantele martor. Extractele de mazăre, bogate în proteine de asemenea s-au dovedit active, provocînd îmbogățirea semințelor de grîu în substanțe proteice. V. E. Zenit [22] a tratat semințele unor cereale cu extractele apoase ale semințelor de cereale de altă natură ; a constatat că prin astfel de tratament se poate ajunge la zdruncinarea eredității plantelor tratate. O. Munteanu, I. Tarjan, F. Preda, M. Radu și C. Popovici [23] au crescut semințele soiului galben de tomate în trituratul frunzelor de tomate soiul Pritchard și au obținut tomate hibride. Rezultate asemănătoare au fost obținute de M. Radu [24] pe alte soiuri de tomate.

Unii cercetători au încercat să aplice o altă variantă experimentală, introducînd direct, prin injecții, sucurile respectiv extractele apoase ale frunzelor unor plante în corpul altora. Acest gen de experiențe, a arătat de asemenea că la plantele tratate pot fi provocate modificări biochimice, fiziologice și chiar morfologice, dintre care unele încep să se manifeste abia la generațiile următoare. Astfel G. H. Molotkovski [25] a injectat în tulpini de floarea-soarelui extracte obținute prin frecarea frunzelor de topinambur cu apă, și a observat că plantele tratate prezintă modificări morfologice apreciabile față de martori, mai ales în ceea ce privește forma capitulului. G. V. Porutki și A. G. Mihailovski [26] au injectat în tulpinile de bumbac extractul apos al frunzelor de *Lavatera trimestris*, preparat după indicațiile date de G. N. Molotkovski, și au constatat pe lîngă creșterea considerabilă a conținutului de apă la pistilele florilor plantelor tratate, o intensificare

remarcabilă a înfloririi și fructificării. În fine, remarcăm lucrarea publicată de E. A. Romanovici [27] care a injectat în tulpinile plantelor de tomate sucul de zîrna neagră (*Solanum nigrum*). În general, la plantele tratate nu s-au produs modificări morfologice, în afara florilor apărute după terminarea tratamentului, care au devenit neregulate și cu petale „bătute". Fructele plantelor tratate de asemenea nu au prezentat deosebiri față de fructele plantelor martor, nici din punct de vedere morfologic și nici în privința conținutului în vitamina C. În schimb, plantele din generația următoare (F_1) obținute din semințele plantelor tratate, se deosebeau net de plante obținute din semințele martor : ele erau mult mai viguroase, aspectul unor frunze era considerabil schimbat, celulele epidermice ale frunzelor au căpătat un aspect sinuos, asemănător, celui al celulelor epidermei frunzelor de zîrnă, iar florile, deși aveau aspectul normal, erau totuși mai puțin pigmentate decît la martori. Deosebirile cele mai importante s-au constatat însă la fructe: cele din F_1 provenite din plantele tratate cu sucul de zîrnă, erau de dimensiuni considerabil mai mari și cu conținutul în vitamină C cu mult mai mic decît fructele din F_1 provenite de la plantele martor.

Aprofundarea investigațiilor în acest domeniu pare a fi promițătoare, dar importanța unor astfel de cercetări iese în evidență prin luarea în considerație a perspectivelor pe care ele le deschid cercetării biochimice. E de ajuns să ne gîndim la faptul că, din moment ce sucurile și extractele plantelor pot provoca la alte plante efecte asemănătoare celor ce se obțin prin altoire, înseamnă că în aceste sucuri și extracte se găsesc anumite substanțe, produse de plante, datorită cărora la plantele tratate se realizează diferite modificări biochimice, fiziologice și morfologice. Izolarea, identificarea și cercetarea minuțioasă a acestor substanțe ar prezenta, atît pentru teorie cît și pentru practică, un interes și o importanță cu totul deosebită. Într-adevăr, cu ajutorul lor s-ar putea păși la dezlegarea mecanismelor intime ale celor mai complicate procese biochimice care stau la baza vieții și înmulțirii organismelor, iar folosirea lor în practica agricolă ar deschide perspective nelimitate pentru crearea de noi soiuri de plante prin dirijarea rapidă, precisă și rațională a naturii și dezvoltării acestora, imprimîndu-le — după dorință și necesitate — cele mai variate însușiri utile.

Lucrările de acest gen, dacă s-ar fi efectuat, ar fi răspuns la întrebarea : „Prin ce și cum se realizează hibridarea plantelor ?" Scopul lor comun ar consta în rezolvarea problemei stabilirii componentelor chimice care intervin în hibridare și precizării mecanismului biochimic al acțiunii lor în cadrul metabolismului vegetal, în vederea cunoașterii bazelor biochimice ale eredității în general și ale hibridării sexuate și vegetative a plantelor în special.

Or, se constată că pînă acum această problemă nu a format obiectul unor cercetări. Nici măcar cercetătorii care au recurs la sucuri și extracte vegetale pentru stabilirea acțiunii lor asupra altor plante, nu au sesizat această problemă, nu au formulat-o și nu și-au îndreptat cercetările spre rezolvarea ei. În această ordine de idei, este semnificativă afirmația făcută de N. A. Maximov [28] în capitolul privitor la hibridarea vegetativă a plantelor din cartea sa „Cursul scurt de fiziologie vegetală" apărută în 1948 : „Avînd în vedere că substanțele nutritive cu și fără azot (zaharuri

solubile, aminoacizi, acizi vegetali etc.) capabile să se deplaseze prin vasele conducătoare, de obicei nu prezintă deosebiri importante la plante de natură diferită, se poate admite că influențarea reciprocă a componentelor altoite se realizează mai ales prin transmiterea substanțelor dotate cu o puternică activitate fiziologică, avînd o acțiune incomparabil mai specializată decît auxinele, vitaminele, alcaloizii, glucozizii etc. Însă această problemă rămîne încă extrem de puțin precizată".

Făcută acum 14 ani, această afirmație își păstrează valabilitatea și astăzi și tocmai de aceea am dori să conturăm aici unele direcții noi de cercetare biochimică, menite să ducă la identificarea acelor substanțe plastice din sucurile și extractele vegetale, care, modificînd însușirile biochimice, fiziologice și morfologice ale altor plante, pot participa activ la dezlănțuirea, întreținerea și dirijarea proceselor biochimice care stau la baza eredității în general și hibridării sexuate și vegetative în special. Vom schița, pentru moment, numai trei asemenea direcții de cercetare:

Prima direcție ar cuprinde investigațiile prin care se urmărește identificarea substanțelor active din sucurile și extractele vegetale, experimentîndu-se direct cu aceste lichide. În acest scop, se aleg plante partenere pe care se vor efectua cercetările, și anume: *planta acceptoare* care va fi tratată cu sucul sau extractul altei plante și *planta donatoare* care va servi la prepararea sucului sau extractului respectiv. Comparînd un astfel de cuplu, format din cei doi parteneri, cu acel sistem vegetal la care se recurge în vederea realizării unei hibridări vegetative prin altoire, ajungem la concluzia că planta acceptoare corespunde în general altoiului, iar planta donatoare — portaltoiului. Este evident că alegerea partenerilor nu poate fi făcută la întîmplare, ci — la fel ca și în hibridarea vegetativă prin altoire — necesită mult discernămînt, ținîndu-se seama de principiile, regulile și condițiile elaborate de știința miciurinistă. O dată partenerii aleși, se procedează la prepararea sucului sau extractului apos al plantei donatoare, ținîndu-se și aici seama de particularitățile ei biochimice. Sucul sau extractul obținut se introduce în planta acceptoare, stabilindu-se în prealabil condițiile de lucru în așa fel încît să fie evitată alterarea lichidului folosit pentru cercetare și asigurîndu-se totodată posibilitatea de introducere în planta acceptoare a cantității necesare de lichid în decursul unui timp dat. Se urmărește atît la planta acceptoare, cît și la descendenții ei apariția modificărilor biochimice, fiziologice și chiar morfologice, sub influența tratamentului. Paralel se fac cercetări analoage, dar folosind pentru tratarea plantelor sucul sau extractul din care în prealabil au fost îndepărtate unele componente, de exemplu componentele proteice. Dacă sucul sau extractul din care au fost îndepărtate unele componente — în cazul exemplului ales: sucul deproteinizat — nu mai provoacă la plantele acceptoare modificări ale însușirilor pe care le provoca sucul sau extractul integral, înseamnă că principiul sau principiile active se aflau printre substanțele îndepărtate, adică sînt de natură proteică. În cazul contrar, principiile active se găsesc în lichidul rămas după îndepărtarea componentelor amintite, și atunci se poate proceda la îndepărtarea unei alte categorii de componente. Astfel, prin eliminarea progresivă a diferitelor categorii de substanțe din sucul sau extractul brut al plantei donatoare, sub controlul permanent a acțiunii

sucului rămas (sau a substanțelor îndepărtate) asupra plantei acceptoare, se poate ajunge la separarea principiilor active, trecînd apoi la stabilirea naturii și structurii lor chimice. Acest procedeu de cercetare corespunde celui folosit curent pentru descoperirea și separarea din produse biologice brute a diferitelor substanțe active, ca : vitamine, hormoni, fermenți și altele. E de subliniat că folosirea concentratelor brute, bogate în principii active,va putea da unele rezultate utile pentru practica agricolă chiar înainte de a se ajunge la faza izolării principiilor active în stare pură.

A doua direcție de cercetare s-ar prezenta sub un alt aspect. Aici nu se mai recurge nici la sucuri, nici la extracte vegetale, ci la diferite „componente plastice" a căror prezență a fost identificată în sucurile și extractele respective, ca zaharuri, aminoacizi, purine, nucleozide, fermenți, hormoni, substanțe proteice etc. Aceste componente se introduc în plantele acceptoare și acțiunea lor asupra acestor plante se compară cu aceea a sucurilor sau extractelor brute. Este evident că prin cercetările de acest gen, se poate stabili repede care anume substanțe conținute în sucuri sau extracte sînt active sau inactive din punctul de vedere ce ne interesează, ceea ce poate contribui la simplificarea cercetărilor care se efectuează în cadrul primei direcții de cercetări. Mai e de adăugat că cercetările de acest gen, în afara hibridării vegetative, mai pot aduce contribuții însemnate și în domeniul nutriției extraradiculare a plantelor, deschizînd astfel calea spre rezolvarea diferitelor probleme biochimice care interesează practica agricolă, ca : obținerea unor producții sporite de fructe și legume, mărirea rezistenței la ger și secetă a viței de vie și a pomilor fructiferi, activarea procesului de legare la plantele legumicole și floricole, mărirea rezistenței plantelor la boli și dăunători, prelungirea repausului de iarnă la pomii fructiferi etc.

Dar, pentru ca cercetările în cele două direcții menționate să fie cît mai eficiente, e necesară efectuarea unor cercetări aprofundate cu privire la rolul factorilor fizico-chimici, metabolici și fiziologici atît în legătură cu pătrunderea lichidelor și diferitelor substanțe în plante, cît și în problema transportului și circulației lor în interiorul organismului vegetal. Investigațiile de acest fel ar forma deci a treia direcție de cercetare, care poate contribui la rezolvarea problemelor biochimice nu numai din domeniul hibridării și eredității plantelor, dar și din alte domenii.

Astfel, considerăm că un interes deosebit pentru practică poate prezenta cercetarea introducerii în plante a soluțiilor substanțelor macromoleculare. Într-adevăr, prin introducerea diferitelor substanțe proteice străine organismului vegetal și cercetarea comportării acestor substanțe în plantă, precum și a reacției plantei față de aceste substanțe proteice, se pot aduce contribuții în domeniul imunochimiei vegetale. La fel, anumite probleme de genetică vegetală vor putea fi studiate introducîndu-se în plante soluții de nucleoproteide, de acizi nucleinici și alți compuși din această categorie, ca : baze purinice și pirimidinice, nucleozide, diferite enzime ca nucleaze, proteaze și altele. Pe lîngă toate acestea, cercetarea pătrunderii soluțiilor celor mai diferite substanțe în corpul plantelor poate aduce contribuții în domeniul toxicologiei vegetale, precum și în alte dome-

nii ale biologiei vegetale, ca acțiunea biochimică a ierbicidelor și diferitelor substanțe utilizate pentru combaterea bolilor și dăunătorilor etc.

Din examinarea celor de mai sus rezultă că rezolvarea diferitelor probleme biochimice care se încadrează în cele trei direcții de cercetare, implică introducerea celor mai diferite sucuri, extracte și soluții în corpul plantelor. Dar, tratarea unor plante cu sucurile și extractele altor plante prin aplicarea diferitelor metode curente, ca : înmuierea semințelor, stropirea aparatului foliar etc., nu se pretează la efectuarea cercetărilor biochimice exacte, deoarece nu permite să se tragă concluzii precise cu privire la viteza de pătrundere și cantitatea diferitelor substanțe pătrunse în plante. Unele procedee mai noi, ca cele propuse de G. H. Molotkovski și G. V. Poruțki [29], S. N. Linzon [30] și altele prezintă și ele unele inconveniente și de asemenea nu se pretează pentru investigații cantitative. S-ar părea că injectarea sucurilor în tulpini sau alte părți ale plantelor, ar corespunde scopului urmărit, garantîndu-se introducerea integrală a sucurilor sau extractelor respective în plante ; totuși, metoda injectării s-a dovedit a fi prea anevoioasă și chiar inaplicabilă în diferite cazuri, fapt semnalat de diferiți cercetători, ca de exemplu E. A. Romanovici [27] și alții.

De aceea, încă acum cîțiva ani am procedat la elaborarea unei metode mai potrivite scopului urmărit și astfel am ajuns la așa numita *metodă capilară* [31] care asigură nu numai introducerea integrală a sucurilor și extractelor diferitelor plante în corpul altora, dar permite urmărirea continuă și exactă a procesului de pătrundere, în condițiile sincronizării acestui proces cu ritmul funcțional al plantei tratate. Principial, această metodă constă în fixarea în corpul plantei, de exemplu în tulpina ei, a capătului liber al unui fitil, format din fire de celuloză, sau din alt material corespunzător, celălalt capăt aflîndu-se într-un vas special în care se găsește sucul sau extractul apos pe care dorim să-l introducem în plantă ; datorită capilarității, lichidul se urcă prin fitil, vine în contact cu vasele conducătoare din tulpină și pătrunde în circuitul sevei. Această metodă deschide unele perspective interesante de cercetare în biochimia și fiziologia vegetală și, alături de diferite alte metode, promite a fi utilă pentru investigații în domeniul eredității și hibridării plantelor.

Printre cercetările efectuate pînă acum cu ajutorul metodei capilare, putem menționa : introducerea soluțiilor și lichidelor biologice în corpul plantelor [32], [33], asimilarea azotatului de amoniu în plantele de tomate [34], acțiunea prolinei introdusă în floarea-soarelui asupra echilibrului diferitelor substanțe cu azot [35], introducerea acidului ribonucleic în plantele de tomate și ardei și influența lui asupra acumulării substanțelor proteice [36], acțiunea hormonilor sexuali asupra plantelor de tomate și gura-leului [37], rolul factorilor fizico-chimici și metabolici în transportul substanțelor în plante [38] și altele.

În afara acestor lucrări publicate, mai avem unele rezultate experimentale încă nepublicate sau în curs de publicare, precum și unele cercetări care se efectuează în colaborare cu Catedra de biochimie a Universității din București, Institutul de cercetări hortiviticole, Institutul agronomic „Nicolae Bălcescu" și altele. Astfel s-au precizat diferitele condiții experimentale necesare asigurării bunului mers al investigațiilor și s-a

stabilit că plantele de tomate absorb cu uşurinţă sucurile şi extractele frunzelor de vinete şi ardei, că în anumite condiţii se pot introduce în viţa de vie cantităţi mari de diferite soluţii şi sucuri provenite atît de la alte soiuri de viţă de vie, cît şi de la viţa sălbatică; că pomii fructiferi acceptă prin metoda capilară sucuri şi soluţii, metabolizînd diferite substanţe care se introduc în ei; că plantele floricole pot fi tratate de asemenea cu sucuri şi extracte vegetale, acestea exercitînd asupra florilor acţiuni diferite; că pot fi introduse în plante ca fasole, mazăre şi bob, cele mai diferite substanţe proteice de origine animală şi vegetală, inclusiv proteine marcate prin coloranţi (azoproteine) etc.

Dar, alături de alte metode, metoda capilară poate găsi aplicaţii nu numai în cercetarea hibridării vegetative şi în dirijarea dezvoltării caracterelor şi însuşirilor în descendenţe hibride dar şi în domeniul hibridării sexuate. Vom da aici un singur exemplu. Se ştie că pentru asigurarea succesului încrucişării plantelor îndepărtate, I. V. Miciurin a imaginat şi a introdus în practică metoda apropierii vegetative prealabile [10]. Această metodă constă în altoirea lăstarului unui pom pe altul cu care nu se încrucişează în condiţii obişnuite. Lăstarii care se prind cresc şi se dezvoltă sub influenţa portaltoiului, deoarece substanţele plastice ale acestuia schimbă însuşirea lăstarului altoit. Cînd lăstarul altoit formează flori, se face polenizarea cu polenul de la portaltoi; şansa de reuşită este mărită datorită apropierii prealabile realizată între cele două feluri de pomi.

Metoda capilară ar simplifica lucrurile. Introducînd încă înainte de înflorire în plantele genetic îndepărtate, ce nu se încrucişează în condiţii obişnuite, sucurile respective, adică sucul plantei A în planta B şi invers, vom realiza o apropiere între ele fără a recurge la altoire. Rămîne ca după înflorire să se aplice polenizarea încrucişată. Ar urma ca seminţele ce se vor obţine să dea naştere la urmaşi hibrizi. Acest procedeu de apropiere vegetativă prealabilă este în curs de experimentare şi în caz de reuşită, va fi util nu numai pomiculturii, căci simplifică şi accelerează mult lucrările, dar va deschide o nouă problemă de biochimie : identificarea, prin cercetări asemănătoare celor descrise mai sus, a componentelor active care intervin aici şi apoi cercetarea proceselor biochimice condiţionate de aceste componente.

Deşi elaborată de curînd, metoda capilară a atras atenţia multor cercetători şi ne-a fost cerută de : L. G. Dobrunov de la Institutul de biologie al Academiei Başkire de ştiinţe, Ufa (U.R.S.S.); H. Taubert, de la Institutul de botanică generală a Universităţii din Jena (R.D.G.); R. Antoszewski, de la Institutul de Fiziologia plantelor al Universităţii din Lodz (Polonia); J. Krekule şi J. Sanderova, de la Institutul de biologie al Academiei de Ştiinţe Cehoslovace din Praga (R. S. Cehoslovacă); D. Guéorguieff şi L. Popoff, de la Institutul pentru cultura plantelor al Academiei Bulgare de ştiinţe, Sofia (R. P. Bulgaria); D. Hess, de la Institutul de botanică al Universităţii din Freiburg, H. Dittrich, de la Institutul de fizică şi meteorologie al Şcoalei superioare de agricultură din Stuttgart-Hohenheim, J. Müller, de la Secţia de biofizică a Institutului de cercetări ştiinţifice din Heiligenberg, F. Heilinger, de la Institutul de cultura plantelor al centrului

de cercetări agronomice din Braunschweig-Völkenrode (R. F. G.); O. W. van Andel, de la Laboratorul de Fitopatologie al Şcoalei superioare de agricultură din Wageningen (Olanda); G. Hollande, de la Facultatea de farmacie a Universităţii din Montpellier, G. Morel, de la Staţiunea centrală de fiziologie vegetală din Versailles (Franţa) şi alţii.

În încheiere, considerăm că unele perspective ale cercetării biochimice în domeniul hibridării vegetative a plantelor, expuse în acest articol, nu sînt simple idei speculative : ele se bazează pe o serie de date din literatură şi pe rezultatele mai multor investigaţii prealabile, efectuate, mai ales cu ajutorul metodei capilare, dîndu-ne convingerea că problemele puse se pot rezolva. De aceea, pornind de la programul sumar de activitate prezentat în această expunere, am început cercetările biochimice într-unul din acele domenii ale biologiei, care ni se pare deosebit de interesant şi important : hibridarea vegetativă şi sexuată a plantelor, scopul final al cercetărilor fiind aducerea de contribuţii noi la stabilirea bazelor biochimice ale eredităţii în general şi ale hibridării plantelor în special.

Prezentată la redacţie la 7 februarie 1962

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., Bucureşti

НЕКОТОРЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ВЕГЕТАТИВНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ

РЕЗЮМЕ

Согласно мичуринскому учению, вегетативная гибридизация растений, производимая прививкой, осуществляется благодаря обоюдному обмену пластическими веществами между привоем и подвоем.

Несмотря на большое количество известных экспериментальных работ, подтверждающих правильность указанной точки зрения, в этой области еще не был поставлен вопрос о выделении и изучении тех веществ, которые появляются в растениях и имеют свойство влиять и изменять обмен веществ, приводя к появлению новых морфобиологических признаков, передаваемых следующим поколениям. Над решением этой задачи работает коллектив Института Биохимии Академии РНР, пользуясь капиллярным методом, который дает возможность вводить в растения соки и вытяжки других растений. Исследования производятся в трех направлениях: первое направление характеризуется тем, что из растительных соков, применяемых для вегетативной гибридизации, последовательно удаляются разные категории веществ для установления тех, которые могут влиять на другие растения. Второе направление характеризуется следующим: в растения вводятся растворы разных веществ растительного происхождения, но с известной структурой с целью установления их активности. Наконец, третье направ-

ление развивается по пути изучения тех физико-химических и физиологических факторов, которые влияют на проникновение растворов в растения в условиях капиллярного метода и на передвижение в растениях проникших в них веществ.

Несмотря на то, что все эти исследования имеют целью изучение биохимических основ вегетативной гибридизации растений, они дают возможность разрешать и другие задачи растительной биохимии, как например, внекорневое питание, иммунитет, морозо- и засухоустойчивости и т.д.

NEW ASPECTS OF BIOCHEMICAL RESEARCH IN VEGETATIVE HYBRIDIZATION

ABSTRACT

According to Mitchourine's conception, the vegetative hybridization of parent plants is realized due to te mutual interchange of plastic substances between the graft and the mother plant. Although in the reference material there are many experimental works, which confirm the accuracy of this conception, however, so far the question of the isolation and identification out of the plant juices of those active compounds participating in the vegetative hybridization process and leading to the hereditary transmissible morphobiological changes, was not considered. This problem constitutes one of the concerns of the Institute of Biochemistry; it may be worked out with the help of the capillary method which has been elaborated in this Institute and involves the carrying out the research in the following main directions: the treatment of plants with whole and partially purified juices from other species; the treatment of plants with solutions of different plastic substances and with mixtures of these substances; the more accurate determination of the agents which intervene in the transfer of the juices and the solutions introduced into the plants by means of the capillary method, particularly in the case of the substances with high molecular weight, such as proteins, nucleic acids, and others; the setting down of biochemical and physico-chemical values characteristic of the changes appearing in plants under the action of the juices and solutions that have been introduced into them. Although these studies are first intended to contribute to the determination of the biochemical grounds of the vegetative hybridization, they might also supply important information in other fields of the biochemistry and plant biology, such as the sexual hybridization, the extraradicular nutrition, the immunity and the heredity, inclusively the phenomenon of heterosis, the frost and drought resistance, and so on.

BIBLIOGRAFIE

1. Т. Д. Лысенко, *Доклад о положении в биологической науке в стенографическом отчете сессии Всесоюзной Академии сельскохозяйственных наук имени В. И. Ленина*, 31 июля — 7 августа, 1948, Москва, 1948.

2. Н. И. ФЕЙГИНЗОН, *Анализ некоторых отрицательных результатов опытов по вегетативной гибридизации.* Ботанический журнал, *10* (1960). Analiza cîtorva rezultate negative ale experienţelor de hibridare vegetativă. An. rom. sov., *2*, 38 (1961) **XV**.
3. CH. DARWIN, *Variation of Animals and Plants under Domestication*, 1868.
4. Ч. ДАРВИН, *Собрание сочинений*, Изд. Лепковского, **VII**, 288 (1928).
5. Ч. ДАРВИН, *Сочинения.* Москва—Ленинград, **IV**, 415 (1951).
6. К. А. ТИМИРЯЗЕВ, *Дарвинизм и селекция.* Сельхозгиз, 23—85 (1937).
7. L. BURBANK, *His methods discoveries and their practical application*, 1914, **VII**, 34.
8. Л. ДАНИЕЛЬ, *Наследование приобретенных признаков у привитых растений.* Яровизация, *3*, 25 (1939).
9. I. E. GLUŞCENCO, *Hibridarea vegetativă a plantelor.* Ed. Academiei R.P.R., 1952.
10. I. V. MICIURIN, *Opere alese.* Ed. Academiei R.P.R., 1954, 7—24.
11. T. D. LÎSENCO, *Agrobiologie.* Ed. de Stat, 1950, 396.
12. А. И. ЕРМАКОВ, *Биохимические изменения у привитых растений.* Вестник социалистического растениеводства, *2*, (1940).
13. Г. С. ИЛЬИН, *О закономерностях образования алкалоидов у привитых растений табака.* Проблемы биохимии в мичуринской биологии. Изд. АН СССР, **I**, 169 (1949).
14. Б. А. РУБИН, Н. М. СИСАКЯН, *Ферментативные системы мичуринских сортов яблони.* Проблемы биохимии в мичуринской биологии. Изд. АН СССР, **I**, 49 (1949).
15. Н. М. СИСАКЯН, И. Е., ГЛУЩЕНКО, Н. В. ВАСИЛЬЕВА, *Наследование приобретенных биохомических признаков в семенных потомствах вегетативных гибридов.* Проблемы биохимии в мичуринской биологии, **I**, 9 (1949).
16. Н. М. СИСАКЯН, *Биохимия обмена веществ.* Изд. АН СССР, Москва, 1954.
17. А. С. КРУЖИЛИН, *Состояние и перспектива исследований взаимовлияния привоя и подвоя растений.* Журнал общей биологии, **XVIII**, *6*, 455 (1957).
18. Г. Х. МОЛОТКОВСКИЙ, *К вопросу о переделке природы растений путем трансплантации.* ДАН СССР, **XXIV**, *6*, (1939).
19. Г. Х. МОЛОТКОВСКИЙ, *Опыты по трансплантации растений.* Яровизация, *4*,(1940).
20. О. Б. ЛЕПЕШИНСКАЯ, *Материалистическое учение о клетке.* Агробиология, *2*, 3 (1951).
21. М. И. ШКОЛЬНИК, Н. А. МАКАРОВА, *Получение изменений в химических процессах методом переработки семян соками других растений.* ДАН СССР, **93** (1953).
22. В. Е. ЗЕНИТ, *Проращивание семян в соках, выжатых из других растений.* Агробиология, 1954, № 5, стр. 146.
23. O. MUNTEANU, I. TARJAN, F. FREDA, M. RADU, C. POPOVICI, *O nouă metodă de hibridare.* Buletin ştiinţific al secţiei de ştiinţe biologice, agronomice, geologice şi geografice, 7, *2*, (1955).
24. M. RADU, *Modificări ereditare la tomate sub influenţa extractului de frunză.* Studii şi cercetări de biologie, seria biologie vegetală, **XII**, *3*, 317 (1960).
25. Г. Х. МОЛОТКОВСКИЙ, *Трансплантация как фактор переделки природы растений.* Научные записки Черновицкого государственного университета, серия биологических наук, **VII**, *2*, 43 (1950).
26. Г. В. ПОРУЦКИЙ, А. Г. МИХАЙЛОВСКИЙ, *Изменение оводненности тканей хлопчатника под влиянием экстрактов из листьев хатьмы трехмесячной*, ДАН СССР, **78**, *3*, 799 (1951).
27. Е. А. РОМАНОВИЧ, *Новый метод вегетативной гибридизации*, Природа, *12*, 103 (1953).
28. Н. А. МАКСИМОВ, *Краткий курс физиологии растений.* ОГИЗ, Москва, 407 (1948).
29. Г. Х. МОЛОТКОВСКИЙ, Г. В. ПОРУЦКИЙ, *Влияние тканевых экстрактов на срастание прививочных компонентов и окоренение черенков.* ДАН СССР, **80**, *6*, 961 (1951
30. S. N. LINZON, *The movement of injected dye solutions in healthy and needle-blighted white Pine trees.* Canadian Journal of Botany, **39**, *3*, 683 (1961).
31. E. MACOVSCHI, *Metoda capilară pentru introducerea compuşilor chimici şi produşilor biologici în corpul plantelor.* Comunicările Acad. R.P.R., **8**, 183 (1958); *Die Verwendung der Kapillarme hode zur Einführung chemischer und biologischer Stoffe in den Pflanzenkörpern.* Preslia, 30, 252 (1958).

32. V. FRUNZETI, L. BUZILĂ, E. GHINEA, *Introducerea unor soluții în plante prin metoda capilară.* Studii și cercetări de biochimie, **2**, 285 (1959).
33. E. MACOVSCHI, *Metoda capilară și aplicațiile ei în biochimia plantelor.* Volumul omagial lui Traian Săvulescu. Ed. Academiei R.P.R., 1959, 1073.
34. E. MACOVSCHI, O. ZAHARIA, L. BUZILĂ, *Asimilația azotatului de amoniu introdus în plante prin metoda capilară.* Studii și cercetări de biochimie, **2**, 17 (1959); *Assimilation de l'azotate d'ammonium introduit par la méthode capillaire dans les tomates.* Revue de Chimie, **5**, 49 (1960).
35. E. MACOVSCHI, O. ZAHARIA, *Acțiunea prolinei asupra aminoacizilor și substanțelor proteice din floarea-soarelui.* Studii și cercetări de biochimie, **3**, 7 (1960).
36. O. ZAHARIA, *Influența acidului ribonucleic asupra acumulării substanțelor proteice în plante.* Studii și cercetări de biochimie, **3**, 201 (1960).
37. V. FRUNZETI, L. BOTOȘĂNEANU S. RĂDULESCU, *Acțiunea dihidrofoliculinei și testosteronei asupra catalazei foliare și a consumului de oxigen la tulpinile de* Solanum lycopersicum *și* Anthir.hinum majus. Studii și cercetări de biochimie, **4**, 357 (1961).
38. E. MACOVSCHI, V. FRUNZETI, L. BOTOȘĂNEANU, *Factorii fizico-chimici și metabolici în transportul substanțelor în plante.* Studii și cercetări de biochimie, **IV** (1961).

NIVELUL FOSFAGENULUI ÎN DIFERITE STĂRI FUNCȚIONALE ALE MUȘCHIULUI

DE

AC. DEMICIAN EUGEN MACOVSCHI și CORINA IORDACHE

Numeroase cercetări cu privire la fosfagenul muscular au arătat că nivelul acestei substanțe în mușchi, adică cantitatea de fosfagen raportată la o anumită cantitate de țesut muscular, prezintă valori destul de caracteristice și relativ constante în condiții normale pentru fiecare mușchi în parte. Astfel P. Eggleton și G. P. Eggleton [1] au stabilit că nivelul fosfagenului în mușchii striați de broască este mai ridicat decît în mușchii netezi ai stomacului aceluiași animal. G. Martino [2] a constatat pe mușchi de iepuri și cobai că în mușchii care se contractă rapid nivelul fosfagenului este superior celui din mușchii cu contracția lentă. A. H. Ennor și H. Rosenberg [3] au arătat că nivelul fosfagenului variază de la organ la organ și este mai mare în mușchii scheletici decît în mușchiul cardiac etc.

Prezintă interes faptul că în diferite stări funcționale sau anormale ale mușchiului, nivelul fosfagenului poate suferi modificări însemnate, cîte o dată caracteristice stării respective. Așa de exemplu G. Martino [4] și T. Masayama [5] au arătat creșterea nivelului fosfagenului în mușchii curarizați. A. Palladin și R. Sigalova [6] și de curînd T. Amako și colaboratori [7] au constatat că denervarea unui mușchi duce la creșterea nivelului său de fosfagen. După G. Martino [8], G. Lange [9], N. N. Iacovlev [10] și alți cercetători, în excitație și în travaliu nivelul fosfagenului muscular scade iar după A. N. Crestovnicov [11] mușchiul antrenat conține mai mult fosfagen decît cel neantrenat etc.

În legătură cu schimbarea nivelului de fosfagen în diferite stări funcționale sau anormale ale mușchiului, s-au formulat diferite păreri. Așa de exemplu O. I. Fainșmidt și M. T. Dmitrenko [12] au ajuns la concluzia că introducerea curarei pare să inhibe procesele producătoare de energie în mușchi prin blocarea degradării fosfagenului și altor substan-

ţe. A. Palladin şi R. Sigalova [6] au considerat că denervarea produce o serie de alterări ale proceselor biochimice din muşchi, care au ca efect creşterea nivelului de fosfagen prin intensificarea proceselor de sinteză a acestei substanţe. Scăderea fosfagenului în muşchii care se contractă este explicată, în general, după M. Polonovski şi colaboratori (13) prin cedarea de grupări fosfatice necesare regenerării ATP-ului etc.

Cercetări mai noi ca cele efectuate cu izotopi radioactivi, de V. A. Grigorieva [14], G. Dixon şi J. Sacks [15], J. Sacks [16] şi alţii arată că fosfagenul, ca şi multe alte substanţe din organism, se găseşte în muşchi într-o „stare dinamică", adică se scindează şi se reface continuu, intensitatea acestui proces fiind denumită „intensitatea de reînnoire". În general, în cadrul procesului de reînnoire se realizează şi se păstrează echilibrul dintre reacţiile de sinteză şi cele de degradare ale substanţei respective. De aceea, cu cît solicitarea fosfagenului în cadrul unei activităţi musculare este mai mare sau mai mică, cu atît „intensitatea de reînnoire" a lui creşte sau scade, intensificîndu-se, respectiv micşorîndu-se în aceeaşi proporţie vitezele celor două reacţii opuse care condiţionează nivelul acestei substanţe în muşchi. Astfel, după D. L. Ferdman [17]: „Ar fi greşit să se creadă că în cazul unui conţinut ridicat în acid creatinfosforic în muşchi... această substanţă este puţin folosită", deoarece „...conţinutul unui produs în muşchi poate să rămînă neschimbat, intensitatea reînnoirii lui depinzînd de intensitatea scindării şi resintezei".

Rezultă că putem distinge două situaţii diferite în ceea ce priveşte nivelul fosfagenului în diferite stări funcţionale ale musculaturii. În unele cazuri, trecerea muşchiului din starea normală într-o stare funcţională care necesită fie o intensificare, fie o micşorare a gradului de participare a fosfagenului la diferite reacţii biochimice, poate fi însoţită numai de schimbarea „stării dinamice" a fosfagenului, adică a intensităţii lui de reînnoire, fără ca să aibă loc vreo schimbare a nivelului acestei substanţe în muşchi. În alte cazuri, ca în cele menţionate la începutul acestei lucrări, schimbarea stării funcţionale poate fi însoţită şi de schimbarea nivelului de fosfagen, această substanţă participînd la o serie de procese biochimice legate de starea funcţională a muşchiului. Într-adevăr, există indicaţii care arată că fosfagenul se poate forma prin cuplarea creatinei cu grupări fosforice provenite de la fosfotrioze şi alţi compuşi [18], că poate elibera gruparea fosforică trecînd fie în creatină [19], fie în creatinină [20], că poate interveni în procesul reversibil al sintezei ATP-ului [21] precum şi în alte reacţii biochimice mai puţin cunoscute. Aceasta înseamnă că deşi relaţiile dintre fosfagen şi activitatea musculară sînt destul de complicate şi încă nu sînt pe deplin lămurite, fapt semnalat de A. H. Ennor şi J. P. Morrison [22], S. V. Perry [23], I. I. Ivanov şi V. A. Iuriev [24] şi alţii, totuşi se poate admite că schimbarea nivelului de fosfagen depinde în mare măsură de deplasarea echilibrului într-unul sau în mai multe din procesele biochimice menţionate, legate de starea funcţională a muşchiului. Cum însă, în stări funcţionale similare se afectează, probabil cam în acelaşi mod, aceleaşi sisteme biochimice musculare, ar fi de aşteptat ca şi nivelul fosfagenului muscular în astfel de stări, să se modifice în acelaşi sens.

După datele din literatură, scoaterea mușchiului de sub controlul nervos prin curarizare sau denervare, face ca nivelul fosfagenului să crească peste normal [4], [5], [6], [7]; ar urma deci ca și în alte condiții similare, ca de exemplu în narcoză în care funcția musculară se efectuează de asemeni în lipsa unui control nervos, să se producă creșterea nivelului de fosfagen. De asemenea, prin analogie, ar fi de așteptat că și în „mișcarea pasivă" a mușchiului, care se efectuează fără participarea activă a sistemului nervos central, să se producă o creștere de fosfagen, deși în cursul ei se produc diferite excitații periferice și reflexe bineuronale slabe (subliminare). Este evident că din cauza acestei participări a sistemului nervos, starea mușchiului în mișcarea pasivă nu este asemănătoare cu stările din curarizare, denervare sau narcoză, totuși dat fiind că excitațiile periferice și reflexele bineuronale amintite sînt subliminare, ar urma ca acestea din urmă să nu împiedice creșterea nivelului de fosfagen condiționată de „mișcarea pasivă". În schimb, ținînd seama că excitația electrică puternică, atît directă cît și indirectă, produce o scădere a nivelului de fosfagen în mușchi [8], [9], ar urma ca distrugerea măduvei spinării, care ca efect se aseamănă cu un tetanos puternic și prelungit, să ducă și ea la scăderea nivelului fosfagenului muscular. În fine, dat fiind că contracția unică provocată de o excitație de scurtă durată nu afectează nivelul fosfagenului muscular [25] rezumîndu-se probabil numai la modificări ale „intensității de reînnoire" ar fi de așteptat ca excitațiile subliminare ca și cele provocate de secționarea nervului sciatic, să nu aibă repercusiuni asupra nivelului fosfagenului muscular.

Pentru a verifica aceste supoziții, am efectuat o serie de determinări ale fosfagenului în mușchii gastrocnemieni de broască atît *in situ*, adică în condițiile organismului întreg, cît și în mușchi izolați din organism. Broaștele (*Rana ridibunda*) au fost capturate în jurul Bucureștiului în perioada aprilie-decembrie 1960 și februarie-decembrie 1961. S-a lucrat la temperatura camerei de aproximativ + 20°C, pe loturi de cîte 10—15 broaște, comparîndu-se — acolo unde era posibil — rezultatele obținute pe mușchii simetrici ai aceluiași animal, dintre care un mușchi a fost supus experimentării, iar celălalt a servit drept martor. Astfel, rezultatele diferitelor experiențe puteau fi comparate între ele, cu toată variația conținutului de fosfagen ce se constată de la animal la animal. Deoarece toate determinările efectuate în aceleași condiții dădeau rezultate similare, nu a fost nevoie să recurgem la calculul statistic, iar pentru ilustrarea fenomenelor constatate a fost suficient să prezentăm în tabele numai cîteva din rezultatele obținute dintr-o serie de măsurători.

Pentru narcoză am folosit eter etilic. Paralel, am efectuat și determinări de fosfagen pe animale curarizate cu flaxedil. „Mișcarea pasivă" a mușchiului s-a executat printr-o mișcare manuală impusă unuia dintre picioare, celălalt picior fiind în repaus. Distrugerea măduvei spinării s-a realizat în modul obișnuit. Denervarea s-a obținut prin secționarea unuia dintre nervii sciatici cu 24 ore înainte de experimentare. Pentru obținerea excitațiilor subliminare, electrozii din fir de argint clorurat se înfășurau direct de picior la nivelul extremităților mușchiului gastrocnemian. Cu ajutorul trenului de impulsuri rectangulare al cronaximetrului de tip

„TuR" RS 3 (R.D.G.) se excita muşchiul gastrocnemian, folosind intensitatea maximă de curent care încă nu provoacă contracţii (aprox. 1,0—1,5 mA). Excitaţia electrică de scurtă durată (aprox. o secundă) se realiza cu ajutorul unei bobine de inducţie la care se ataşau electrozii de argint cloruraţi.

Imediat după experimentare se tăiau picioarele şi se aruncau în azot lichid, între sfîrşitul experienţei şi momentul îngheţării trecînd cel mult o secundă; apoi se îndepărta pielea şi se scotea de la tendon muşchiul gastrocnemian îngheţat.

Dozarea fosfagenului am efectuat-o după K. Lohmann [26], folosind în principiu metoda lui C. H. Fiske şi Y. Subbarow [27]. Metoda este descrisă exact într-o altă lucrare [28]. Vom menţiona doar că în dozare am respectat indicaţiile date de A. Palladin şi D. Ferdman [29]. Colorimetrarea s-a făcut la un fotocolorimetru tip FEK (U.R.S.S.) cu filtru roşu. Rezultatele s-au exprimat în mg P_2O_5 raportat la 1 g muşchi proaspăt. Prin scăderea valorii „fosforului anorganic real" din aceea a „fosforului determinabil direct" se obţinea fosforul fosfagenic. Valoarea obţinută se raporta apoi la aceea a „fosforului determinabil direct" şi se exprima în procente faţă de acesta din urmă.

După cum se ştie, valorile fosfagenului ce se obţin în muşchii simetrici ai aceluiaşi animal, sînt concordante între ele; cîteva din rezultatele obţinute pe broaşte în repaus sînt date în tabela 1.

Tabela 1

Valorile normale ale fosforului determinabil direct, ale fosforului anorganic real şi ale fosforului fosfagenic din muşchiul gastrocnemian de broască (*Rana ridibunda*) *in situ* **şi repaus** (aprilie-mai 1960)

(mg P_2O_5/g muşchi proaspăt)
D = muşchi drept; S = muşchi stîng.

Nr. crt.		Fosfor determinabil direct	Fosfor anorganic real	Fosfor fosfagenic	Fosfor fosfagenic % faţă de fosfor determinabil direct
1		2	3	4	5
1	D	2,17	1,02	1,15	53
	S	2,12	0,98	1,14	54
2	D	2,08	0,96	1,12	54
	S	2,02	1,11	0,91	45
3	D	1,82	0,97	0,85	46
	S	1,99	1,12	0,87	44

În ceea ce priveşte nivelul fosfagenului în muşchiul gastrocnemian al broaştelor narcotizate nu am găsit indicaţii în literatură. Se ştie însă că anestezia cu eter reduce reacţia muşchiului striat la stimularea nervoasă şi că acţiunea eterului se deosebeşte, probabil, de aceea a curarei doar prin tipul de blocaj [30]. Cum, în cazul narcozei datorită scoaterii muşchiului de sub controlul nervos, ca în curarizare, era de aşteptat o creştere a nivelului de fosfagen muscular, am prezentat pentru comparaţie, în tabela 2, rezultatele obţinute atît pe broaşte narcotizate prin eter cît şi pe cele curarizate prin flaxedil. Menţionăm că narcoza se realiza cu ajutorul unui tampon

de vată îmbibat cu eter etilic care se așeza sub clopotul de sticlă în care se țineau broaștele timp de 1—2 ore, iar curarizarea se făcea prin injectarea în sacul dorsal al broaștei a 1 ml soluție flaxedil $2^0/_{00}$, experimentîndu-se după o oră, cînd relaxarea era profundă și efectul de redresare complet suprimat.

Tabela 2

Fosforul determinabil direct, fosforul anorganic real și fosforul fosfagenic al mușchiului gastrocnemian de broască (*Rana ridibunda*) **normal, curarizat sau narcotizat** *in situ* **și repaus** (aprilie-mai 1961)
(mg P_2O_5/g mușchi proaspăt)
D = mușchi drept; S = mușchi stîng; N = normal; C = curarizat; E = narcoza cu eter

Nr. crt.		Fosfor determinabil direct			Fosfor anorganic real			Fosfor fosfagenic			Fosfor fosfagenic % față de fosfor determinabil direct		
		N	C	E	N	C	E	N	C	E	N	C	E
1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	D	2,28	2,15	1,95	1,14	0,36	0,34	1,12	1,79	1,61	49	83	82
	S	2,40	2,26	2,04	0,99	0,40	0,30	1,39	1,86	1,74	42	82	85
2	D	2,45	2,52	1,58	1,30	0,30	0,38	1,15	2,22	1,20	47	88	76
	S	2,50	2,52	1,63	1,26	0,45	0,27	1,24	2,07	1,36	49	81	83
3	D	2,63	2,79	1,78	1,19	0,67	0,22	1,44	2,12	1,56	55	76	87
	S	2,50	2,81	1,85	1,03	0,36	0,24	1,46	2,45	1,61	58	85	87

Din examinarea raportului dintre fosforul fosfagenic și fosforul determinabil direct (tabela 2, coloanele 12 și 13) se constată că atît în narcoză cît și în curarizare, raportul acesta crește considerabil față de martor, prezentînd în ambele cazuri valori de același ordin de mărime. Din acest punct de vedere, acțiunea eterului asupra fosfagenului muscular se aseamănă cu aceea a flaxedilului. De asemenea, se mai constată și o altă analogie dintre acțiunea narcotică a eterului și acțiunea curarizantă a flaxedilului, în sensul că în ambele cazuri scăderea fosforului anorganic muscular față de conținutul normal este cam aceeași (tabela 2, coloanele 6 și 7). Analiza mai atentă a rezultatelor arată însă că alături de acest paralelism, există anumite deosebiri care demonstrează că mecanismul de acțiune al celor două substanțe asupra nivelului fosfagenului muscular este diferit. Astfel, după îndelungata narcoză cu eter, se constată o scădere considerabilă a fosforului determinabil direct, pe cînd în curarizare valorile fosforului determinabil direct sînt practic egale cu acelea ale mușchiului normal. În schimb, valorile absolute ale fosforului fosfagenic în curarizare cresc considerabil față de cele normale, pe cînd în narcoza cu eter diferențele față de normal sînt mici apropiindu-se de limitele erorilor experimentale. Rezultă de aici că, dacă atît în narcoza cu eter, cît și în curarizarea prin flaxedil, raportul dintre fosforul fosfagenic față de fosforul determinabil direct este practic același, și depășește considerabil valorile raportului din mușchii animalelor martor, cauza creșterii acestui raport este diferită. În cazul narcozei cu eter, raportul crește datorită scăderii fosforu-

lui determinabil direct, fosforul fosfagenic rămînînd practic în limitele normale, pe cînd în curarizarea cu flaxedil creşterea raportului se datoreşte creşterii nivelului fosfagenului muscular deoarece curarizarea nu aduce modificări în valorile fosforului determinabil direct.

Pe lîngă experienţele de mai sus, efectuate pe muşchii animalelor narcotizate, am cercetat nivelul fosfagenului la muşchii supuşi „mişcării pasive" (passive Bewegung). Am considerat că muşchiul silit să execute contracţii ritmice fără a primi impulsurile corespunzătoare din partea sistemului nervos, se găseşte într-o stare funcţională asemănătoare cu aceea a muşchiului curarizat, denervat sau narcotizat. Era deci de aşteptat ca mişcarea pasivă să fie însoţită şi ea de o creştere a nivelului fosfagenului muscular.

Mişcarea pasivă a muşchiului se executa imprimînd manual piciorului drept al broaştei mişcări ritmice, asemănătoare celor de înot, efectuînd 80—100 mişcări de contracţie-întindere pe minut timp de 10 min. Piciorul stîng rămînea în repaus. Imediat după terminarea mişcării pasive, ambele picioare se tăiau şi se aruncau în azot lichid.

Rezultatele analizelor (tabela 3) arată că în muşchiul supus mişcării pasive se produce o creştere a fosforului fosfagenic (tabela 3, coloana 4) şi o scădere a fosforului anorganic real (tabela 3, coloana 3), fosforul determinabil direct păstrînd aceleaşi valori ca şi muşchiul în repaus. De aceea, raportul dintre fosforul fosfagenic şi fosforul determinabil direct exprimat în procente, prezintă valori mai mari la muşchii supuşi mişcării pasive decît la muşchii în repaus (tabela 3, coloana 5).

Tabela 3

Fosforul determinabil direct, fosforul anorganic real şi fosforul fosfagenic al muşchiului gastrocnemian de broască (*Rana ridibunda*) *in situ*, **supus „mişcării pasive"** (octombrie-noiembrie 1960)
(mg P_2O_5 /g muşchi proaspăt)
D = muşchiul piciorului drept supus mişcării pasive;
S = muşchiul piciorului stîng în repaus.

Nr. crt.		Fosfor determinabil direct	Fosfor anorganic real	Fosfor fosfagenic	Fosfor fosfagenic % faţă de fosfor determinabil direct
1		2	3	4	5
1	D	1,98	1,15	0,83	42
	S	2,01	1,41	0,60	30
2	D	2,78	1,58	1,20	43
	S	2,22	1,67	0,54	25
3	D	1,20	0,69	0,51	42
	S	1,27	0,91	0,36	28
4	D	1,55	0,61	0,94	61
	S	1,76	1,08	0,69	39
5	D	1,01	0,31	0,69	69
	S	1,13	0,65	0,48	42
Valori medii	D	1,70	0,86	0,83	51
	S	1,67	1,14	0,53	33

Menționăm că în literatură nu am găsit astfel de experiențe și nici determinări de fosfagen în asemenea condiții. Am întîlnit doar experiențe cu „tensiune pasivă" (passive Belastung) [31] în care autorii au tensionat mușchii animalului curarizat prin atîrnare de greutăți la unul din capetele lor, lucrînd deci în cu totul alte condiții.

Trecînd acum la cercetarea nivelului fosfagenului în mușchiul gastrocnemian de broască imediat după distrugerea măduvei spinării, am ținut seama de faptul că excitarea puternică provocată de această distrugere ar putea să se repercuteze asupra fosfagenului muscular nu numai prin acțiunea nervoasă directă asupra mușchiului, dar și prin mecanisme indirecte (de exemplu prin intermediul sistemului endocrin). De aceea, pe lîngă experiențele efectuate pe broaște cu măduva spinării distrusă, am efectuat și o serie de experiențe pe animale la care unul dintre mușchi aflat *in situ* era denervat. Astfel, excludeam pe de o parte transmisia excitației nervoase provocată de distrugerea măduvei spinării la mușchiul lipsit de principala inervație, iar pe de altă parte puteam constata dacă prin distrugerea măduvei spinării nivelul fosfagenului muscular poate fi modificat prin mecanismele indirecte menționate.

Denervarea se făcea cu 24 ore înainte de experiență; apoi imediat după distrugerea măduvei spinării atît a broaștelor normale cît și a celor cu un mușchi denervat se tăiau ambele picioare și se aruncau în azot lichid.

După cum se constată din datele analizelor obținute pe broaște normale cu măduva spinării distrusă, în comparație cu broaște normale (tabela 4) distrugerea măduvei spinării duce la o scădere pronunțată a fosfagenului muscular la ambii mușchi gastrocnemieni, însoțită de o creștere a fosforului anorganic real. În consecință, cifrele care exprimă fosforul

Tabela 4

Fosforul determinabil direct, fosforul anorganic real și fosforu fosfagenic a mușchiului gastrocnemian de broască (*Rana ridibunda*) **normală și cu măduva spinării distrusă** (decembrie 1961)

(mg P_2O_5/g mușchi proaspăt)

D = mușchi drept; N = normală;
S = mușchi stîng; S = cu măduva spinării distrusă

Nr. crt.		Fosfor determinabil direct		Fosfor anorganic real		Fosfor fosfagenic		Fosfor fosfagenic % față de fosfor determinabil direct	
		N	S	N	S	N	S	N	S
1		2	3	4	5	6	7	8	9
1	D	2,17	2,01	0,82	1,08	1,35	0,93	62	46
	S	2,36	1,91	0,93	1,23	1,43	0,68	61	36
2	D	2,16	2,03	0,92	1,13	1,24	0,90	57	45
	S	2,03	2,09	0,86	1,06	1,17	1,03	57	49
3	D	2,08	2,46	0,90	1,49	1,18	0,97	56	39
	S	2,28	2,16	1,06	1,26	1,22	0,90	54	42
Valori medii		2,18	2,11	0,91	1,21	1,26	0,90	58	43

fosfagenic în procente faţă de fosforul determinabil direct sînt mai joase în cazul broaştelor cu măduva spinării distrusă decît în cazul celor normale (tabela 4, coloanele 8—9). Menţionăm că, datorită variaţiilor individuale destul de mari ale valorilor fosforului determinabil direct, am ales pentru comparaţie broaştele care atît normale, cît şi cu măduva spinării distrusă, ne-au dat aproximativ aceleaşi valori pentru fosforul determinabil direct. Comparaţia rezultatelor în aceste condiţii arată că modificarea nivelului fosfagenului, în cazul distrugerii măduvei spinării, se datoreşte descompunerii parţiale a fosfagenului muscular cu eliberarea cantităţii corespunzătoare de fosfat anorganic liber.

Tabela 5

Fosforul determinabil direct, fosforul anorganic real şi fosforul fosfagenic al muşchiului gastrocnemian de broască (*Rana ridibunda*) **cu măduva spinării distrusă şi denervată** *in situ* (decembrie 1961)

(mg P_2O_5/g muşchi proaspăt)

D = muşchi drept denervat;
S = muşchi stîng martor.

Nr. crt.		Fosfor determinabil direct	Fosfor anorganic real	Fosfor fosfagenic	Fosfor fosfagenic % faţă de fosfor determinabil direct
1		2	3	4	5
1	D	2,28	0,84	1,44	63
	S	1,90	1,20	0,70	37
2	D	2,32	0,84	1,48	64
	S	2,22	1,14	1,08	48
3	D	2,13	0,91	1,22	57
	S	1,92	1,25	0,67	35

Rezultate similare s-au obţinut şi în cazul broaştelor cu unul dintre muşchii gastrocnemieni denervaţi. După cum rezultă din tabela 5, distrugerea măduvei spinării provoacă o scădere puternică a nivelului fosfagenului şi o creştere corespunzătoare a fosforului anorganic real la muşchiul cu inervaţia intactă, dar nu produce nici o schimbare la nivelul fosforului fosfagenic şi al celui anorganic real la muşchiul denervat. De altfel, atît valorile absolute ale fosforului fosfagenic şi ale fosforului anorganic real, cît şi cele ale fosforului fosfagenic exprimat în procente faţă de fosforul determinabil direct concordă cu valorile prezentate în tabela 4 : în cazul muşchiului nedenervat, aceste valori (tabela 5) corespund cu rezultatele obţinute pe broaşte cu măduva spinării distrusă (tabela 4), iar în cazul muşchilor denervaţi (tabela 5), corespund cu cele obţinute pe broaşte normale (tabela 4). Această concordanţă arată că scăderea fosfagenului muscular provocată prin distrugerea măduvei spinării se datoreşte acţiunii directe a excitaţiei nervoase asupra muşchiului menţionat, fără intervenţia vreunui alt mecanism.

În privinţa excitaţiilor subliminare, respectiv a excitaţiilor de scurtă durată, era de aşteptat ca ele să nu modifice nivelul fosfagenului muscular

şi aceasta cu atît mai mult cu cît, după W. F. H. M. Mommaerts [25] o singură contracţie nu schimbă conţinutul de creatinfosfat, iar după A. Fleckenstein şi colaboratori [32] contracţia tetanică poate avea loc independent de scindarea fosfagenului în fibra musculară şi numai după un tetanos prelungit se poate observa o scindare apreciabilă a fosfagenului. Experienţele noastre, efectuate atît pe broasca *in situ*, cît şi pe muşchi izolat, ne-au arătat că excitaţiile slabe subliminare cît şi cele de scurtă durată, de aproximativ o secundă, aplicate muşchiului gastrocnemian al broaştelor, nu sînt însoţite de vreo modificare a nivelului de fosfagen (tabela 6, coloanele 5 şi 9), confirmînd astfel aşteptările.

Tabela 6

Fosforul determinabil direct, fosforul anorganic real şi fosforul fosfagenic al muşchiului gastrocnemian de broască (*Rana ridibunda*) **supus** *in situ* **şi izolat excitaţiilor electrice subliminare sau de scurtă durată** (decembrie 1961)

(mg P_2O_5/g muşchi proaspăt)

Nr. crt.		Muşchi *in situ*				Muşchi izolat			
		D = muşchi drept supus excitaţiilor subliminare directe 1,0—1,5 mA timp de 10 min S = muşchi stîng repaus				D = muşchi drept excitat electric timp de o secundă S = muşchi stîng repaus			
		Fosfor determinabil direct	Fosfor anorganic real	Fosfor fosfagenic	Fosfor fosfagenic % faţă de fosfor determinabil direct	Fosfor determinabil direct	Fosfor anorganic real	Fosfor fosfagenic	Fosfor fosfagenic % faţă de fosfor determinabil direct
1		2	3	4	5	6	7	8	9
1	D	2,47	1,11	1,36	55	2,07	0,82	1,25	60
	S	2,54	0,96	1,58	62	2,07	0,80	1,27	61
2	D	2,68	1,44	1,24	46	2,08	0,75	1,33	64
	S	2,41	1,39	1,02	45	2,09	0,79	1,30	62
3	D	1,89	0,81	1,08	57	2,19	0,85	1,34	61
	S	2,28	1,10	1,18	52	2,14	0,86	1,28	60

La fel, am constatat că secţionarea nervului sciatic, care produce o scurtă şi slabă excitare a muşchiului gastrocnemian, nu se repercutează asupra nivelului fosfagenului muscular. Experienţe de acest gen le-am efectuat atît pe picioare întregi, cît şi pe preparate neuromusculare la care, înainte de îngheţarea muşchilor în azot lichid, nervii sciatici corespunzători muşchiului drept erau secţionaţi încă de două ori, muşchii gastrocnemieni ai piciorului stîng ai căror nervi au fost secţionaţi numai o singură dată servind ca martor. Din datele cuprinse în tabela 7 rezultă că valorile fosforului determinabil direct, ale fosforului anorganic real şi ale fosforului fosfagenic, precum şi cele ale fosforului fosfagenic exprimate

în procente faţă de fosforul determinabil direct din muşchii ai căror nervi au fost secţionaţi de trei ori, sînt practic identice cu valorile ce se obţin în cazul unei singure secţionări.

Tabela 7

Fosforul determinabil direct, fosforul anorganic real şi fosforul fosfagenic al muşchiului gastrocnemian de broască (*Rana ridibunda*) al picioarelor şi preparatelor neuromusculare excitate prin tăiere (decembrie 1961)

(mg P_2O_5/g muşchi proaspăt)

D = picior sau preparat neuromuscular, tăiat de trei ori;
S = picior sau preparat neuromuscular, tăiat o dată.

Nr. crt.		Picioare tăiate				Preparate neuromusculare			
		Fosfor determinabil direct	Fosfor anorganic real	Fosfor fosfagenic	Fosfor fosfagenic % faţă de fosfor determinabil direct	Fosfor determinabil direct	Fosfor anorganic real	Fosfor fosfagenic	Fosfor fosfagenic % faţă de fosfor determinabil direct
1		2	3	4	5	6	7	8	9
1	D	2,18	1,18	1,00	46	2,09	1,04	1,05	50
	S	2,20	1,18	1,02	46	2,02	1,09	0,93	46
2	D	2,23	0,69	1,54	69	2,27	1,22	1,05	46
	S	2,20	0,70	1,50	68	2,28	1,19	1,09	48
3	D	2,12	0,93	1,19	56	2,29	0,91	1,38	60
	S	2,04	0,70	1,34	65	2,21	0,87	1,34	61

După cum se constată din materialul prezentat în această lucrare, sensul schimbării nivelului fosfagenului în muşchiul gastrocnemian de broască în diferite condiţii experimentale, poate fi prevăzut dacă se admite că nivelul fosfagenului muscular depinde de echilibrul diferitelor procese biochimice legate de starea funcţională a muşchilor şi că în stări funcţionale similare se afectează cam în acelaşi mod aceleaşi sisteme biochimice ale muşchiului. Într-adevăr, atît în narcoza cu eter cît şi în condiţiile mişcării pasive, s-a constatat o creştere a nivelului fosfagenului ca în cazurile cunoscute de curarizare şi denervare. Cu această ocazie a ieşit la iveală faptul că în narcoza cu eter creşterea fosfagenului se realizează printr-un alt mecanism decît în curarizare. Apoi, s-a constatat că în muşchii gastrocnemieni ai broaştelor, imediat după distrugerea măduvei spinării, nivelul fosfagenului scade ca şi în cazurile cunoscute de excitaţii directe şi indirecte, puternice şi prelungite. În fine, s-a stabilit că excitaţiile subliminare şi de scurtă durată, ca şi cele provocate de secţionarea repetată a nervului sciatic, nu se repercutează asupra nivelului de fosfagen muscular.

Prezentată la redacţie la 7 februarie 1962

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., Bucureşti

СОДЕРЖАНИЕ ФОСФАГЕНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ МЫШЦЫ

РЕЗЮМЕ

Содержание фосфагена в икроножной мышце лягушки изменяется в одном и том же направлении, когда в мышце имеют место сходные, с функциональной точки зрения, но различные по своей природе, физиологические изменения. Так, в случае как наркоза, так и пассивного движения мышцы наблюдается возрастание содержания мышечного фосфагена, сходное с известным возрастанием его при деннервации или кураризировании; нервные возбуждения, вызванные разрушением спинного мозга животных, сопровождаются понижением содержания фосфагена, сходным с констатируемым при прямом или косвенном электрическом возбуждении; при очень слабых возбуждениях содержание фосфагена не изменяется.

TAUX DU PHOSPHAGÈNE AUX DIFFÉRENTS ÉTATS FONCTIONNELS DU MUSCLE

RÉSUMÉ

Le taux du phosphagène dans le muscle gastrocnémien de la grenouille varie dans le même sens, lorsque se produisent dans le muscle des modifications physiologiques d'une nature différente, mais semblables au point de vue fonctionnel. Aussi, soit qu'il s'agisse de narcose provoquée, soit d'un mouvement passif du muscle, on constate une hausse du taux du phosphagène musculaire semblable à celle connue dans la dénervation ou dans la curarisation des animaux ; les excitations nerveuses provoquées par la destruction de la moelle épinière sont accompagnées d'une baisse du taux du phosphagène, semblable à celle constatée dans l'excitation électrique directe ou indirecte ; le taux du phosphagène ne varie pas dans les excitations sous-liminaires.

BIBLIOGRAFIE

1. P. EGGLETON, G. P. EGGLETON, *Further observations on phosphagen.* J.Physiol., **65**, 15 (1928).
2. G. MARTINO, *The physiological significance of phosphocreatine in the muscle.* C.A., **24**, 1666[7] (1930).
3. A. H. ENNOR, H. ROSENBERG, *The determination and distribution of phosphocreatine in animal tissue.* Biochem. J., **51**, 606 (1952).
4. G. MARTINO, *Curarization and phosphagen content of striated muscles* C.A., **22**, 2621 (1928).
5. T. MASAYAMA, *The effect of severing the nerve paths upon the chemical changes induced in muscles by toxins with stimulate the sympathetic system.* C.A., **26**, 2508[8] (1932).
6. A. PALLADIN, R. SIGALOVA, *Contribution à l'étude de la biochimie de l'acide créatine-phosphorique. L'influence de la section du nerf sur le taux de l'acide créatine-phosphorique dans le muscle.* Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 1263 (1933).

7. T. AMAKO, J. KOGA, S. NAKAYAMA, Y. MORISHIMA, S. YOSHINAGA, *Biochemical studies on paralysed muscles.* C. A., **54**, 21396e (1960).
8. G. MARTINO, *The behaviour of phosphagen in muscular tetany.* C.A., **24**, 405^{6} (1930).
9. G. LANGE, *Über die Dephosphorylierung von Adenosintriphosphat zu Adenosindiphosphat während der Kontraktionsphase von Froschrektusmuskeln.* Biochem. Z., **326**, 172(1955).
10. Н. Н. ЯКОВЛЕВ, *Зависимости углеводно-фосфорного обмена в работающих мышцах от состояния центральной нервной системы.* Укр. биох. ж., **XXVII**, *4*, 444 (1955).
11. A. N. CRESTOVNICOV, *Studii de fiziologie a exerciţiilor fizice.* Editura cultură fizică şi sport, 1953, 302.
12. O. I. FAINSHMIDT, M. T. DMITRENKO, *The effect of curare on the chemical processes involved in muscular activity.* C.A., **34**, 2462^{5} (1940).
13. M. POLONOVSKI, P. BOULANGER, M. MACHEBOEUF, J. ROCHE, *Biochimie médicale.* Masson, Paris, 1952, 407.
14. В. А. ГРИГОРЬЕВА, *Интенсивность обновления фосфорных соединений в мышцах при денервации.* Укр. биох. ж. **XXX**, *3*, 356 (1958).
15. G. DIXON, J. SACKS, *Occurrence of phosphate exchanges in muscular contraction.* Am. J. Physiol., **193**, *1*, 129 (1958).
16. J. SACKS, *Prolonged muscular activity without phosphate exchange.* Nature, **183**, 825 (1959).
17. Д. Л. ФЕРДМАН, *Данные по изучению функциональной биохимии мышц* Изв. Акад. Наук СССР, с. биол., *3*, 348 (1960).
18. O. CORI, A. TRAVERSO-CORI, M. LAGARRIGUE, F. MARCUS, *Enzymic phosphorylation of creatine by 1: 3-diphosphoglyceric acid.* Biochem. J., **70**, 633 (1958).
19. A. CANTAROW, M. TRUMPER, *Clinical biochemistry.* W. B. Saunders Company, Philadelphia and London, 1956, 11.
20. H. BORSOOK, J. W. DUBNOFF, *The hydrolysis of phosphocreatine and the origin of urinary creatinine.* J. Biol. Chem., **168**, 493 (1947).
21. D. M. NEEDHAM, *Biochemistry of muscular action*, în G. H. BOURNE, *The structure and function of muscle.* Acad. Press, New York and London, 1960, II, 61.
22. A. H. ENNOR, J. F. MORRISON, *Biochemistry of the phosphagens and related guanidines.* Physiol. rev., **38**, *4*, 631 (1958).
23. S. V. PERRY, *The biochemistry of muscle.* Ann. Rev. of Biochem., **30**, 473—498 (1961).
24. И. И. ИВАНОВ, В. А. ЮРЬЕВ, *Биохимия и патобиохимия мышц*, Медгиз, Ленинградское отделение, 1961, 57.
25. W. F. H. M. MOMMAERTS, *Investigation of presumed breakdown of ATP and phosphocreatine during a single muscle twitch.* C.A., **50**, 2807^{e} (1956).
26. K. LOHMANN, *Über die Isolierung verschiedener natürlichen Phosphorsäureverbindungen und die Frage ihrer Einheitlichkeit.* Biochem. Z., **194**, 306 (1928).
27. C. H. FISKE, Y. SUBBAROW, *The colorimetric determination of phosphorus.* J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).
28. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, C. DRAGOMIRESCU, *Fosfagenul în diferite stări de activitate şi excitabilitate musculară.* Studii şi cercet. biochimie, **IV**, *2*, 173 (1961).
29. A. PALLADIN, D. FERDMAN, *Kreatinphosphorsäure*, în *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Berlin, 1936, **V**, Teil *5 A*, 905.
30. L. S. GOODMAN, A. GILMAN, *Bazele farmacologice ale terapeuticei.* Ed. med., Bucureşti, 1960, ed. a II-a, 59.
31. L. JENDRASSIK, J. FAISZT, *Die ersten chemischen Prozesse der Muskelkontraktion.* Ann. Univ. Sci. Budapest. Rolando Eötvös nom. Sect. Biol., **I**, 133 (1957).
32. A. FLECKENSTEIN, J. JANKE, G. LECHNER, G. BAUER, *Zerfällt Adenosintriphosphat bei der Muskelkontraktion?* Pflügers Arch. Ges. Physiol., **259**, 246 (1954).

FORMAREA PEROXIZILOR LIPIDICI ÎN ȚESUTURILE ȘOBOLANILOR IRADIAȚI ȘI RADIOPROTEJAȚI

DE

O. COSTĂCHEL, M. FURNICĂ și V. DRAGON

În radiobiologie se consideră că unul din mecanismele presupuse a interveni în producerea leziunilor de iradiere ar fi apariția peroxizilor, ca urmare a acțiunii radiațiilor ionizante. Peroxizilor formați în țesuturi li se atribuie în general o acțiune toxică, manifestată prin efecte antimitotice, inhibiție enzimatică, denaturarea proteinelor, inhibiția fosforilării oxidative etc. [1].

În lucrări anterioare [2], [3] am arătat că la șobolanii iradiați, în prezența sau în absența substanțelor radioprotectoare, efectul asupra acizilor nucleici se manifestă în mod diferit, observîndu-se pe de o parte intensități diferite în gradul de scădere al acizilor nucleici, iar pe de altă parte, viteze diferite în capacitatea țesuturilor de a-și restaura cantitatea inițială de acizi nucleici. Aceste date au permis punerea în evidență a existenței unei „protecții diferențiate" [4], urmînd ca cercetări viitoare să studieze pe de o parte mecanismele ce stau la baza acestui răspuns diferențiat, iar pe de altă parte să pună în evidență acest efect și prin alte teste specifice.

Deoarece se consideră că peroxizii joacă un rol important în producerea efectului radiobiologic, în lucrarea de față am urmărit acumularea peroxizilor lipidici în diferite țesuturi iradiate, precum și posibilitatea de a preveni formarea acestor compuși, protejînd animalele de experiență față de iradiere, prin inhibiția sistemului nervos cu ajutorul largactilului [5].

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe un număr total de 80 șobolani albi, normali, adulți de 80—100 g, teleiradiați cu doze de 1 000 R.

Iradierea s-a efectuat cu 180 kV, 10 mA, 0,5 mm Cu + 0,5 mm Al filtru, 100 cm distanță focar-piele, 9 R/min.

Un număr de 30 animale au primit cu 10 min înainte de iradiere doza de 5 mg/kg corp largactil. După 1, 2, 3, 4, 5, 7 şi 8 zile de la iradiere animalele au fost sacrificate, recoltîndu-se pe gheaţă ţesuturile alese pentru lucru : creier, ficat, splină.

Dozarea peroxizilor lipidici s-a efectuat prin metoda cu acid 2-tiobarbituric (TBA). Acest reactiv, în prezenţa peroxizilor acizilor graşi nesaturaţi, formează o coloraţie roz-portocalie, cu maximum de absorbţie la 530 mμ [6].

Citirile au fost efectuate la spectrofotometrul „Universal" Zeiss-Jena, iar rezultatele au fost exprimate în extincţia (ε) produsă de cantităţi identice de ţesut (200 mg).

REZULTATE

Rezultatele experienţelor sînt prezentate în tabela 1 şi figurile 1—3. *În ţesuturile normale* (neiradiate) se constată o cantitate mică de peroxizi. Cantitatea cea mai mică de peroxizi se găseşte în creier ; ficatul şi în special splina conţin cantităţi mai mari de peroxizi lipidici (tabela 1).

Tabela 1

Variaţiile peroxizilor în ţesuturile normale

Ţesutul	$\varepsilon_{530\ m\mu}$ (reacţia TBA)
Creier	0,023±0,003
Ficat	0,043±0,005
Rinichi	0,095±0,010
Splină	0,116±0,006

În *ţesuturile iradiate* se constată în general o intensificare a reacţiei cu TBA, ca urmare a creşterii peroxizilor lipidici în ţesuturi sub influenţa radiaţiilor ionizante. Apariţia peroxizilor lipidici nu se face în toate ţesuturile cu aceeaşi intensitate şi nici la intervale egale de la data iradierii.

Astfel, în *creier* (fig. 1) se observă o creştere importantă a peroxizilor lipidici numai în ziua a 4-a de la iradiere (creşte cu 87% faţă de normali). Creşterea peroxizilor lipidici prezintă valori maxime după 5 zile de la iradiere (creşte cu 118% faţă de normali) după care se constată o revenire spre valori normale.

În cazul animalelor iradiate sub protecţie de largactil, curba acumulării peroxizilor este, ca aspect, paralelă cu curba reprezentînd variaţiile peroxizilor în ţesuturile iradiate, dar se menţine în permanenţă la un nivel mai scăzut. Şi în acest caz cantitatea maximă de peroxizi se constată tot în ziua a 5-a de la iradiere, dar valorile absolute sînt mai mici decît în lotul iradiat fără protecţie (48% creştere faţă de normali).

În *ficat* (fig. 2), la lotul iradiat se observă, începînd din ziua a 3-a, o creştere a peroxizilor, care atinge valori maxime după 7 zile (218% creştere faţă de normali) şi începe să scadă în ziua a 8-a.

În lotul iradiat sub protecţie, creşterea peroxizilor, deşi importantă, nu atinge valorile observate la animalele martore (creşterea este de numai 67%) şi nici nu respectă paralelismul observat în cazul creierului.

Splina (fig. 3) este organul în care acumularea peroxizilor lipidici prezintă creşterile cele mai timpurii. Chiar din prima zi de la iradiere se constată o creştere importantă a peroxizilor lipidici (48%), care continuă şi în zilele următoare, atingînd valori maxime în ziua a 3-a şi a 4-a de la începutul experienţei (115%). Începînd din ziua a 5-a, peroxizii lipidici din splină încep să scadă.

În lotul iradiat sub protecţie, la fel ca în cazul creierului, curba acumulării peroxizilor este paralelă cu aceea reprezentînd lotul iradiat fără protecţie, dar cu valori mult mai mici. Abia după 4 zile de la iradiere se observă în acest lot o creştere importantă a peroxizilor (85%), după care valorile încep să scadă.

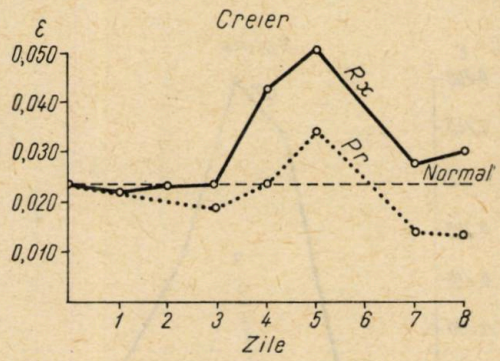


Fig. 1. — Variaţiile peroxizilor lipidici în creierul şobolanilor iradiaţi cu 1000 R (curba Rx) şi iradiaţi sub protecţie de largactil în doză de 5 mg/kg corp (curba Pr).

ε = extincţia (530 mμ) corespunzătoare unei cantităţi de 200 mg ţesut (reacţia cu acid 2-tiobarbituric).

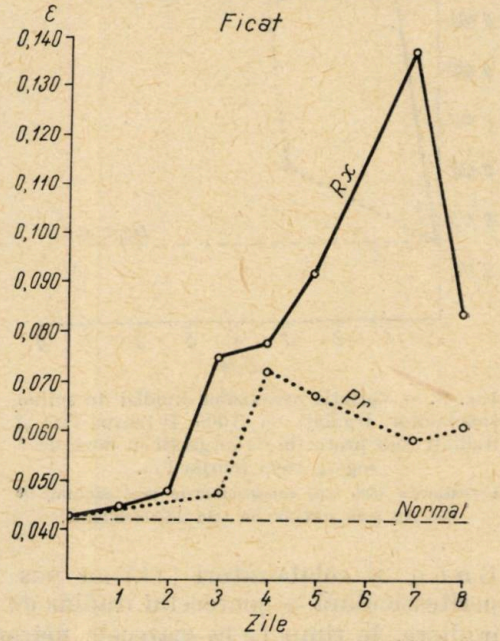


Fig. 2. — Variaţiile peroxizilor lipidici în ficatul şobolanilor iradiaţi cu 1000 R (curba Rx) şi iradiaţi sub protecţie de largactil în doză de 5 mg/kg corp (curba Pr).

ε = extincţia (530 mμ) corespunzătoare unei cantităţi de 200 mg ţesut (reacţia cu acid 2-tiobarbituric).

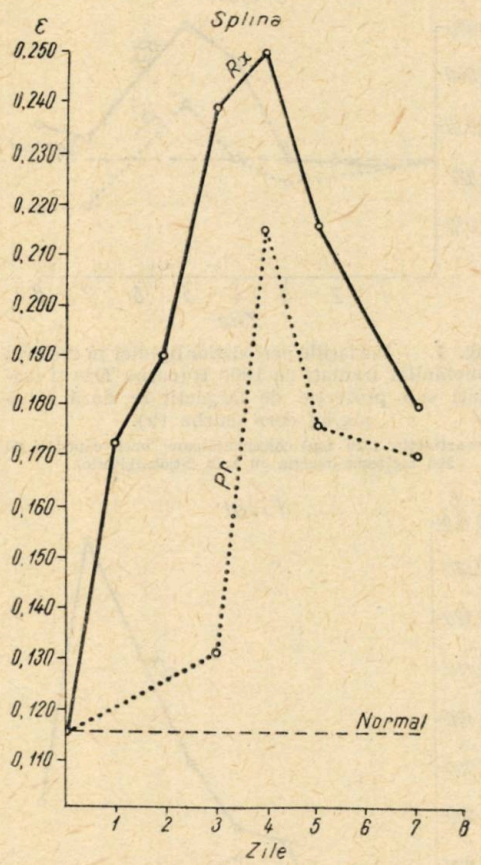
DISCUŢII

Peroxidarea în ţesuturile normale (neiradiate)

Apariţia peroxizilor lipidici este rezultatul oxidării acizilor graşi nesaturaţi prezenţi în celula vie. Este bine stabilit faptul că mitocondriile conţin aproximativ 25% lipide, dintre care majoritatea o constituie acizii graşi nesaturaţi [7].

Peroxizii lipidici sînt substanţe toxice pentru organism. În mod normal ei se găsesc în canti-

tăţi mici în ţesuturi, formarea lor fiind frînată de prezenţa vitaminei E, cel mai puternic antioxidant găsit în ţesuturile normale. Funcţia biologică a vitaminei E, ca antioxidant al lipidelor nesaturate, este larg cunoscută şi susţinută de dovezi puternice [8]. Ea se manifestă la nivelul enzimelor din mitocondrii, în sensul că evită formarea peroxizilor care acţionează ca inhibitori cunoscuţi ai activităţii enzimatice. Alterarea preparatelor de mitocondrii, avînd ca urmare pierderea activităţii enzimatice, se datoreşte tocmai fenomenului de peroxidare. S-a relevat din ce în ce mai clar faptul că peroxidarea lipidelor în omogenate de ţesuturi sau particule subcelulare, nu este o reacţie enzimatică [9], că ea poate fi accelerată de prezenţa acidului ascorbic şi inhibată de α-tocoferol, quercetină şi EDTA [10].



Flg. 3. — Variaţia peroxizilor lipidici în splina şobolanilor iradiaţi cu 1000 R (curba Rx) şi iradiaţi sub protecţie de largactil în doză de 5 mg/kg corp (curba Pr).

ε = extincţia (530 mμ) corespunzătoare unei cantităţi de 200 mg ţesut (reacţia cu acid 2-tiobarbituric).

Deşi intensitatea reacţiei cu TBA în ţesuturile normale studiate de noi este destul de slabă, totuşi ea nu se datoreşte în întregime peroxizilor, ci şi intervenţiei aldehidei malonice şi aldehidelor aromatice, care dau cu TBA produşi de condensare avînd maximum de absorbţie la 450 mμ [6].

Peroxidarea în ţesuturile iradiate

Ipoteza care tinde să explice acţiunea radiaţiilor asupra mediului biologic prin intervenţia radicalilor liberi a dus la considerarea formării peroxizilor ca urmare a acţiunii acestor radicali. Z. M. Bacq şi colaboratori [11] au pus în evidenţă peroxizi în grăsimea peritesticulară a şoarecelui iradiat cu doza de 1000 R, după 30 min de la iradiere, în timp ce la şoarecele neiradiat se observă o reacţie slab negativă. P. Dubouloz şi colaboratori [12], prin metoda cu tiofluoresceină, semnalează prezenţa cantităţilor foarte mici de peroxizi în urma acţiunii diferiţilor agenţi fizici: căldură, frig, radiaţii ultraviolete sau radiaţii X, aplicate pe piele, în doză necrotică.

Prezența și creșterea peroxizilor lipidici se datorește procesului rapid de autooxidare a grăsimilor, printr-un mecanism de formare de radicali liberi.

Ansamblul cercetărilor efectuate asupra formării peroxizilor în boala de iradiere a permis diferențierea a două tipuri de peroxizi : primari și secundari [13]. Peroxizii primari apar în primele momente ale iradierii, în timp ce peroxizii secundari se formează după un oarecare timp de latență, care poate varia de la cîteva ore la cîteva zile. O dată apăruți peroxizii secundari, leziunea biologică evoluează în același fel, indiferent de cauza care le-a dat naștere (radiații, arsuri etc.). Celula este invadată de peroxizi, care ajung la o concentrație foarte ridicată, ducînd la moartea celulei.

Rezultatele noastre au pus în evidență faptul că sub acțiunea dozei de 1000 R are loc o acumulare treptată de peroxizi lipidici în țesuturile șobolanilor iradiați.

De la început apare clar că ceea ce am determinat noi prin aceste dozări reprezintă peroxizii considerați „secundari", deci rezultați din reacțiile în lanț produse în celulă în faza a doua a postiradierii.

După intensitatea reacției cu acidul 2-TBA rezultă că unele țesuturi sînt mai ușor predispuse la peroxidare, în timp ce altele se peroxidează mai greu. Astfel, în splină și ficat se acumulează o cantitate foarte mare de peroxizi, fapt care este de altfel în concordanță cu faptul că aceste organe suferă și alte modificări intense, biochimice și anatomopatologice. Creierul de asemenea acumulează o cantitate mare de peroxizi, dar, spre deosebire de splină, unde modificările apar din prima zi de la iradiere, în acest organ peroxizii cresc după 4 și 5 zile de la începutul experienței.

Un fapt care ni s-a părut interesant de urmărit ar fi acela al punerii în evidență a unei relații între cantitățile crescute de peroxizi lipidici și lezarea diferitelor procese biochimice sub acțiunea radiațiilor ionizante. Din experiențele noastre anterioare [2], în care șobolanii au fost iradiați în condiții identice, reieșea că tulburarea metabolismului acizilor nucleici în creier și ficat se produce din primele 24 ore de la iradiere și prezintă modificări maxime după 3 sau 5 zile, în funcție de organul studiat și de componentul la care ne referim, ARN sau ADN. Deoarece în aceleași organe, valorile peroxizilor apar crescute, în medie cu 2 zile întîrziere în raport cu începutul scăderii acizilor nucleici, nu putem considera scăderea acizilor nucleici din aceste organe ca fiind rezultanta acțiunii exercitate de cantitățile crescute de peroxizi. Relația între scăderea acizilor nucleici și apariția peroxizilor ar putea fi valabilă numai în următoarele condiții :

— admițînd că o cantitate foarte mică de peroxizi lipidici (nedecelabili prin testul cu TBA) ar fi suficientă pentru inducerea leziunilor biochimice celulare ;

— efectul s-ar datora peroxizilor primari și nu mai are legătură cu peroxidările secundare declanșate în celulă.

Peroxidarea în ţesuturile radioprotejate

Acţiunea substanţelor radioprotectoare la nivelul ţesuturilor a fost explicată în diferite moduri. Una dintre ipotezele care au încercat să lămurească mecanismul intim de acţiune al radioprotectorilor a fost aceea a lui Z. M. Bacq şi P. Alexander [14], legată de fenomenul de peroxidare. Bacq consideră că radioprotectorii împiedică peroxidarea macromoleculelor biologice, deoarece reacţionează cu radicalii oxidanţi formaţi în apa iradiată şi în acest fel evită acţiunea acestora asupra substratului biologic. Această ipoteză se referă în special la substanţele protectoare care conţin grupări —SH.

V. Malţ [15], urmărind formarea peroxizilor în ficatul şobolanilor iradiaţi sub protecţie de cisteină, constata că protectorul măreşte numai perioada de inducţie, dar nu împiedică dezvoltarea reacţiei în lanţ.

Din experienţele noastre a reieşit că acumularea peroxizilor lipidici în ţesuturi radioprotejate cu largactil nu este evitată, dar cantitatea de peroxizi formaţi este mai mică decît în ţesuturile iradiate, iar uneori apare mai tîrziu. Desigur că în acest caz, spre deosebire de experienţa citată mai sus, cu cisteină, nu poate fi vorba de o reacţie chimică, între protector şi peroxizi, după mecanismul presupus de Bacq. Se poate deci trage concluzia că inhibiţia sistemului nervos în timpul iradierii apără ţesuturile de peroxidare ulterioară intensă, printr-un mecanism încă necunoscut, aşa cum protejează şi alte procese biochimice.

CONCLUZII

1. Sub acţiunea dozei de 1000 R apar peroxizi lipidici în splină după 24 ore, în ficat după 3 zile şi în creier după 4 zile de la iradiere. Aceşti peroxizi cresc în timp, ating valori maxime şi apoi încep să scadă.

2. Se observă un paralelism între radiosensibilitatea ţesuturilor şi viteza de apariţie a peroxizilor în ţesuturi (radiosensibilitatea scăzînd în ordinea splină, ficat, creier).

3. Iradierea sub protecţie cu largactil împiedică formarea cantităţilor mari de peroxizi. În aceste condiţii ficatul apare organul cel mai bine protejat.

Prezentată la redacţie la 26 ianuarie 1962

Institutul oncologic, Bucureşti

ОБРАЗОВАНИЕ ЛИПИДНЫХ ПЕРЕКИСЕЙ В ТКАНЯХ ОБЛУЧЕННЫХ И РАДИОЗАЩИЩЕННЫХ КРЫС

РЕЗЮМЕ

При облучении крыс дозами в 1 000 R констатируется появление липидных перекисей (реакция с 2-тиобарбитуровой кислотой) — в селезенке через 24 часа, в печени через 3 дня и в мозгу через 4 дня после

облучения. Максимальные значения содержания перекисей наблюдаются через 4 дня в селезенке (возрастание на 115%, по сравнению с нормой), через 5 дней в мозгу (118%) и через 7 дней в печени (218%), а затем начинают понижаться.

Облучение под защитой ларгактила (5 мг/кг веса) не препятствует появлению перекисей, но содержание их меньше (на 85% больше в селезенке, на 48% больше в мозгу и на 67% больше в печени, по сравнению с нормой).

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Изменения липидных перекисей в мозгу крыс, облученных 1 000 R (кривая Rx), и крыс, облученных под защитой ларгактила в количестве 5 мг/кг веса (кривая Pr). ε — экстинкция (530 мμ), соответствующая 200 мг ткани (реакция с 2-тиобарбитуровой кислотой).

Рис. 2. — Изменения липидных перекисей в печени крыс, облученных 1 000 R (кривая Rx), и крыс, облученных под защитой ларгактила в количестве 5 мг/кг веса (кривая Pr). ε — экстинкция (530 мμ), соответствующая 200 мг ткани (реакция с 2-тиобарбитуровой кислотой).

Рис. 3. — Изменения липидных перекисей в селезенке крыс, облученных 1000 R (кривая Rx), и крыс, облученных под защитой ларгактила в количестве 5 мг/кг веса (кривая Pr). ε — экстинкция (530 мμ), соответствующая 200 мг ткани (реакция с 2-тиобарбитуровой кислотой).

FORMATION DES PEROXYDES LIPIDIQUES DANS LES TISSUS DES RATS IRRADIÉS ET RADIOPROTÉGÉS

RÉSUMÉ

Après l'irradiation des rats aux doses de 1000 R, on constate au bout de 24 heures (par la réaction au 2-TBA), l'apparition des peroxydes lipidiques dans la rate; au bout de 3 jours dans le foie et de 4 jours dans le cerveau. Les peroxydes atteignent des valeurs maximales au bout de 4 jours dans la rate (accroissement de 115% par rapport à la normale), de 5 jours dans le cerveau (118%) et de 7 jours dans le foie (218%), pour diminuer par la suite.

L'irradiation sous protection de largactil (5 mg/kilocorps) n'empêche pas l'apparition des peroxydes, qui continuent à se former en quantités moindres (accroissement de 85% dans la rate, de 48% dans le cerveau, de 67% dans le foie, par rapport à la normale).

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Variation des peroxydes lipidiques dans le cerveau des rats irradiés à 1000 R (courbe Rx) et irradiés sous protection de largactil, à la dose de 5 mg/kilocorps (courbe Pr).

ε = extinction (530 mμ) correspondant à une quantité de 200 mg de tissu (réaction à l'acide 2-thiobarbiturique).

Fig. 2. — Variation des peroxydes lipidiques dans le foie des rats irradiés à 1000 R (courbe Rx) et irradiés sous protection de largactil, à la dose de 5 mg/kilocorps (courbe Pr).

ε = extinction (530 mμ) correspondant à une quantité de 200 mg de tissu (réaction à l'acide 2-thiobarbiturique).

Fig. 3. — Variation des peroxydes lipidiques dans la rate des rats irradiés à 1000 R (courbe Rx) et irradiés sous protection de largactil, à la dose de 5 mg/kilocorps (courbe Pr).

ε = extinction (530 mμ) correspondant à une quantité de 200 mg de tissu (réaction à l'acide 2-thiobarbiturique).

BIBLIOGRAFIE

1. B. N. TARUSOV, An. rom.-sov., seria generală, *3* 36 (1958).
2. O. COSTĂCHEL, M. FURNICĂ, O. POPOVICI, G. FURNICĂ, *Rolul protecţiei prin AET asupra variaţiilor acizilor nucleici în ţesuturile iradiate.* Com. la S.S.M. Cercul de oncologie, şedinţa din 26 mai, 1959.
3. O. COSTĂCHEL, M. FURNICĂ, G. FURNICĂ, O. POPOVICI, Studii şi cercetări de biochimie, **III**, *1*, 21 (1960).
4. O. COSTĂCHEL, M. FURNICĂ, N. VOICULET, *Données expérimentales sur la protection d'organe par l'AET.* Com. la Simpozionul de radiobiologie, Roma, 15—29 iunie, 1960.
5. O. COSTĂCHEL, G. FURNICĂ, O. POPOVICI, M. FURNICĂ, Studii şi cercetări de biochimie, **II**, *2*, 139 (1959).
6. Б. Х. ХОМУТОВ, А. ГАРКУША, Вопросы медицинской химии, **6**, *4*, 431 (1960).
7. A. L. TAPPEL, H. ZALKIN, Arch. Biochem. Biophys., **80**, *1—2*, 326 (1959).
8. H. DAM, Pharmacol. Rev., **9**, *1* (1957).
9. J. G. BIERI, A. A. ANDERSON, Arch. Biochem. Biophys., **90**, 101 (1960).
10. A. BARBER, A. OTTOLENGHI, Proc. Soc. Exptl. Biol., Med., **90** 471 (1957).
11. Z. M. BACQ, C. BURG, A. CHEVALIER, C. HEUSGHEM, J. Physiol., **43**, *4*, 640 (1951).
12. P. DUBOULOZ, J. DUMAS, J. VIGNE, C.R. Soc. Biol., **144**, *2*, 1080 (1950).
13. P. DUBOULOZ, J. DUMAS, Bull. Soc. Chim. Biol., **36**, 983 (1954).
14. Z. M. BACQ, P. ALEXANDER, *Principes de radiobiologie*, Ed. Masson, Paris, 1955, 388.
15. В. МАЛИЦ, Биофизика, **V**, *5*, 546 (1960).

DATE BIOCHIMICE ÎN LEGĂTURĂ CU SEMNIFICAȚIA ACTIVITĂȚII CATEPSINELOR DIN ȚESUTURILE CANCEROASE ȘI NECANCEROASE

DE

I. KIȚULESCU și V. BĂLUȚĂ

Noile progrese realizate în domeniul localizărilor intracelulare ale enzimelor, cu ajutorul microscopului electronic, au făcut mai acută problema rolului fiziologic al diferitelor activități enzimatice.

Cunoașterea marilor fenomene biologice normale sau patologice este strîns dependentă de profunzimea la care poate ajunge cercetarea mecanismelor prin care enzimele participă în momente bine definite la desfășurarea acestor fenomene.

Activitatea proteazelor ocupă locul central în fenomenul proliferării normale sau patologice ca și în cel al lizei și autolizei tisulare; totuși a rămas încă neclar și deci mult discutat rolul lor atît în creșterea cît și în regresia țesuturilor.

Catapsinele, proteaze intracelulare considerate multă vreme inactive pe toată durata vieții celulare, intrînd în acțiune numai în momentul autolizei acestora, încep să fie considerate astăzi cu mult interes ca participînd activ la desfășurarea ciclului vital al celulei.

Astfel, F. E. Lehman [1] remarcă rolul catepsinelor în morfogeneza țesuturilor datorită faptului că aceste enzime fac parte din conținutul lizozomilor a căror bogăție intracelulară este în relație cu intensitatea încorporării proteinelor în țesuturi.

B. Sylven și H. Malmgren [2] găsesc că stratul periferic al tumorilor (celulele A) care proliferează activ, conține o activitate cateptică mai mare decît stratul interior învecinat (celulele B) care proliferează mai lent.

G. Benz [3] aduce date în plus la rezultatele obținute de Sylven și Malmgren confirmînd activitatea catepsinică crescută a regiunii periferice tumorale.

Relația dintre activitatea proteazelor și funcțiile celulare a fost sugerată și în lucrări mai vechi și cercetată sub numeroase aspecte.

S-a găsit o corelație între activitatea celulelor nervoase și activitatea protează.

A. P o p e [4] a stabilit că principalele locuri ale activității proteolitice în cortexul cerebral sînt corpii celulelor nervoase venind cu rezultatele sale în sprijinul lucrărilor prin care H y d é n (citat de [4]) a demonstrat că în timpul activității nervoase există o rapidă încorporare a proteinelor.

Deoarece în relație cu activitatea nervoasă a fost găsită și acetilcolinesteraza, am căutat să aflăm dacă nu există vreun raport bine definit între activitatea protează intracelulară și activitatea acetilcolinesterazelor deși topografia acestor enzime nu este asemănătoare, acetilcolinesteraza aflîndu-se localizată la suprafața dendritelor, axonilor și în special la capetele sinaptice [4].

N. D e m i n [5] a găsit că activitatea catepsinelor este crescută prin adaosul de acetilcolină însă această creștere este slabă și inconstantă. Influența acetilcolinei asupra activității catepsinelor cerebrale a fost găsită de noi mai puternică în creierul șobolanilor purtători de tumori decît în creierul șobolanilor necanceroși.

Modul prin care acetilcolina poate interveni în activitatea protează începe să capete unele deslușiri deoarece adăugînd CoA într-un mediu biologic (omogenat tisular) în care se află o protează activă la pH=5 (papaina) am reușit ca din activarea slabă și inconstanța pe care acetilcolina o dădea papainei să obținem o activare importantă a acestei enzime, activare care nu se obține fără acetilcolină, numai prin adaos de CoA.

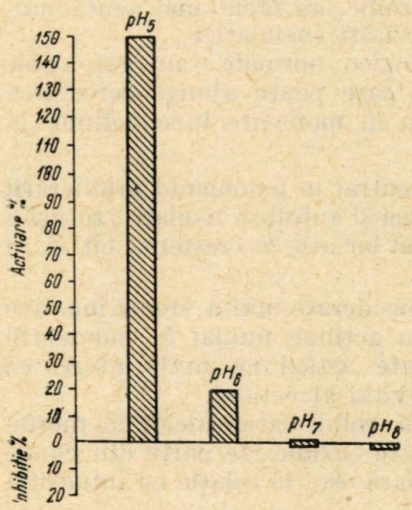


Fig. 1. — Influența acetilfosfatului asupra pH-ului de activitate al tripsinei.

Rolul de activator protează exprimat de către un compus de natura „acetatului activ" și participarea acetilcolinei la realizarea acestui produs sînt astfel sugerate.

O confirmare în această direcție am căpătat-o punînd în contact o soluție de tripsină cu o soluție de acetilfosfat provenit din sarea de argint a acestuia sau din acetilfosfatul de litiu. Acetilfosfatul modifică unele caractere ale tripsinei și anume pe acelea legate de influența pH-ului asupra activității enzimei. Tripsina capătă în contact cu acetilfosfatul posibilitatea de a fi activă la pH=5 aproape în aceeași măsură ca la pH=8 [6] (fig. 1).

Extinderea capacității de activitate a tripsinei în domeniul de activitate al catepsinelor poate prezenta un deosebit interes fiziologic avînd în vedere intervenția posibilă a catepsinelor în echilibrul dinamic (dintre

liza și sinteza proteică) existent în celule. Rolul catepsinelor în proliferarea celulară, menționat anterior, poate fi desigur pus în legătură cu modificarea selectivă a acestui echilibru.

Dacă însă un compus macroergic cum este acetilfosfatul poate modifica centrii activi ai enzimei dîndu-i astfel de proprietăți, realizarea unei influențe atît de puternice prin acetilcolină poate fi mai greu concepută dacă se consideră acetilcolina ca atare.

Utilizarea produșilor rezultați din activitatea acetilcolinesterazei asupra acetilcolinei pentru sinteza unui compus macroergic de tipul acetilfosfatului care să poată influența activitatea proteazică, a fost susținută de rezultatele următoarelor experiențe.

Am studiat încorporarea glicinei marcate cu ^{14}C (la carboxil) în proteinele unei tumori cu creștere activă (homografă tumorală provenind din sarcom de metilcolantren) și de asemenea încorporarea glicinei ^{14}C în proteinele unei tumori în regres (heterografa aceleiași tumori).

Încorporarea aminoacidului marcat a fost cercetată sub influența acetilfosfatului și a acetilcolinei, colinesterazele fiind active sau inhibate prin ezerină. S-au avut de asemenea în vedere condiții diferite pentru activitatea proteazică : încorporarea aminoacidului la pH = 5 (domeniul de pH al activității optime a catepsinelor) și la pH = 7 (domeniul de pH al activității optime a tripsinei).

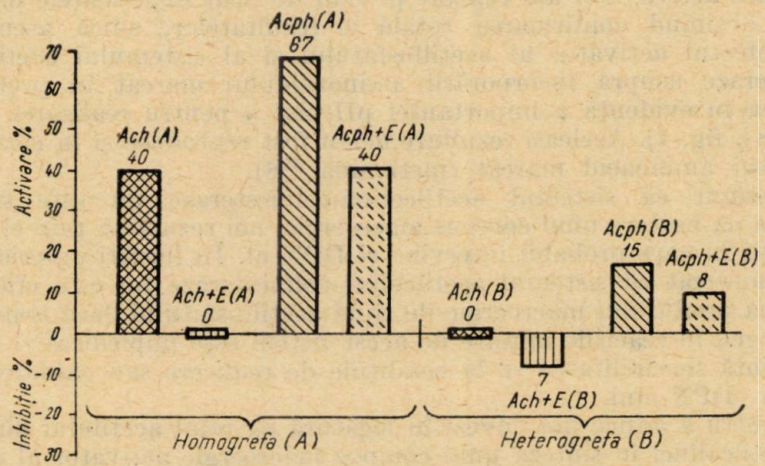


Fig. 2. — Încorporarea glicinei ^{14}C în proteinele homo- și heterografei tumorale sub influența acetilfosfatului, la pH=5.

Ach = influența acetilcolinei; Acph = influența acetilfosfatului; Ach + E = influența acetilcolinei + ezerină; Acph + E = influența acetilfosfatului + ezerină; A = homografă tumorală ; B = heterografă tumorală.

A rezultat [7] (fig. 2) o puternică activare a încorporării aminoacidului în proteinele tumorii cu creștere activă, sub influența acetilfosfatului, la pH = 5. Inhibiția colinesterazelor prin ezerină micșorează puțin această activare.

O puternică activare a încorporării aminoacidului în proteinele tumorii cu creștere activă produce și acetilcolina, însă inhibarea colinesterazelor prin ezerină reduce total această activare, demonstrîndu-se astfel că acetilcolina este importantă în acest proces numai după ce s-au produs reacțiile datorită contactului acetilcolinei cu enzima sa de hidroliză.

Asemănarea dintre acțiunea acetilfosfatului și acțiunea sistemului acetilcolină-colinesteraze reiese și din faptul că nici acetilcolina și nici acetilfosfatul nu reușesc să producă această influență activatoare asupra încorporării aminoacidului în proteine dacă tumora este în regres.

De asemenea, activarea importantă produsă de acești factori asupra încorporării aminoacidului în proteine scade accentuat în cazul acetilfosfatului sau este redusă total în cazul acetilcolinei dacă experiența se efectuează la pH = 7 și nu la pH = 5 (fig. 3).

Din aceste experiențe rezultă de asemenea importanța pH-ului 5 pentru a se diferenția o proliferare activă a unui țesut de o inhibiție puternică a acestei proliferări.

Deci, rolul catepsinelor în creșterea activă tumorală poate fi susținut în relație cu un produs macroergic de tipul acetilfosfatului.

G. B e n z [3] demonstrînd activitatea cateptică crescută în stratul periferic al tumorii remarcă o asemănare între nivelul acestei activități și activitatea catepsinelor din ficat care se știe că posedă proprietatea de regenerare activă. Noi am repetat pe felii de ficat experiențele făcute pe tumori obținînd confirmarea totală a rezultatelor, adică asemănarea dintre efectul activator al acetilfosfatului și al sistemului acetilcolină-colinesteraze asupra încorporării aminoacidului marcat în proteine și scoaterea în evidență a importanței pH-ului 5 pentru realizarea acestui efect ([8], fig. 4). Aceleași rezultate ne-au fost reproduse și în cazul utilizării altui aminoacid marcat (metionina ^{35}S).

Desigur că sistemul acetilcolină-colinesteraze nu este suficient pentru a da naștere unui compus macroergic, noi rezumăm prin el o suită de reacții în care probabil intervine și DPN-ul. În lucrări anterioare [9] am demonstrat că sistemul acetilcolină-colinesteraze nu este eficient în generarea produsului macroergic de tipul acetilfosfatului dacă transportul de hidrogen în reacțiile inițiate de acest sistem este împiedicat și am pus în evidență sensibilitatea sa la condițiile de reducere sau oxidare accentuată a DPN-ului.

Pentru a aduce noi dovezi în legătură cu rolul acetilului din molecula acetilcolinei în sinteza unui compus macroergic activator al catepsinelor, am încercat să punem în evidență arsenoliza acestui produs activator.

Arsenoliza care se bazează pe acetilarea arseniatului sub forma acetil~ arseniat, compus instabil care se hidrolizează rapid dînd acetat inactiv, se știe că a fost studiată de E. R. S t a d t m a n [10] ca proces de hidroliză a acetilfosfatului. Reacțiile sînt cuplate cu formarea Ac ~S CoA și pot fi schematizate astfel

$$\begin{aligned}
&Ac \sim P + CoA \rightleftharpoons Ac \sim S\ CoA + P\\
&Ac \sim S\ CoA + Arseniat \longrightarrow Ac \sim As + CoA\\
&Ac \sim As + H_2O \longrightarrow Acetat + arseniat
\end{aligned}$$

În experiențele noastre am studiat influența arseniatului asupra activării pe care o suferă într-un mediu biologic (omogenat tisular) o protează activă la pH = 5 (papaina), activarea fiind datorită intervenției acetilcolinei și CoA adăugate omogenatului tisular.

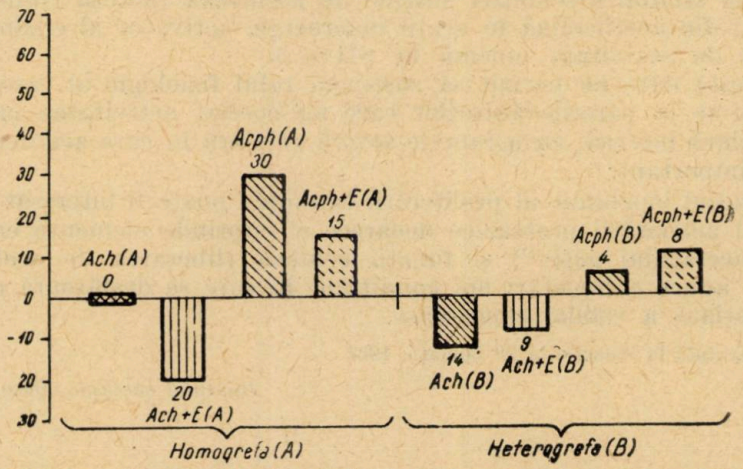


Fig. 3. — Încorporarea glicinei ^{14}C în proteinele homo- și heterografei tumorale sub influența acetilfosfatului, la pH=7.

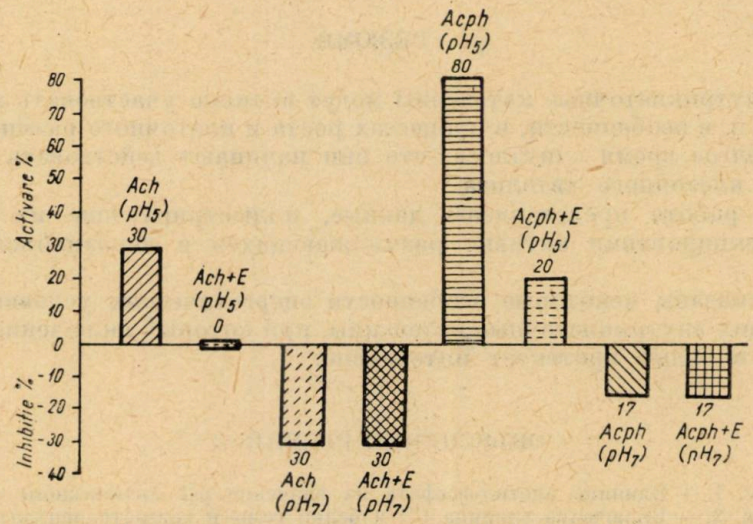


Fig. 4. — Încorporarea glicinei ^{14}C în proteinele ficatului de șoarece sub influența acetilfosfatului.

Arseniatul nu influențează activitatea papainei în condițiile ei de activitate obișnuită, însă reduce total activarea accentuată pe care acetilcolina + CoA o produc asupra activității papainei. Rezultă că activarea

papainei se obține printr-un acetil macroergic, acetilul provenind de la acetilcolină deoarece CoA fără acetilcolină nu determină această activare. Hidroliza acestui produs macroergic, determinată de arsenoliză, împiedică procesul de activare a papainei.

Deci studiul arsenolizei susține de asemenea ipoteza transformării acetilului din acetilcolină în acetil macroergic activator al enzimelor, cu domeniu de activitate optimă la pH = 5.

Aceste date ne permit să susținem rolul fiziologic al catepsinelor, asociindu-ne la părerile autorilor care au corelat activitatea proteazică intracelulară intensă, cu o funcție activă celulară în care acetilcolina are un rol important.

Studiul biochimic al proliferării tumorale poate fi interesat în acest aspect al activității proteazice deoarece el cuprinde elemente energetice (rolul „acetatului activ") și funcții celulare (liberarea de acetilcolină) care pot aduce completări noi condițiilor în care se desfășoară creșterea nediferențiată a celulei canceroase.

Prezentată la redacție la 29 ianuarie 1962

Institutul oncologic, București

БИОХИМИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ, СВЯЗАННЫЕ С АКТИВНОСТЬЮ КАТЕПСИНОВ В РАКОВЫХ И НЕРАКОВЫХ ТКАНЯХ

РЕЗЮМЕ

Внутриклеточные катепсины могут активно участвовать в жизни клеток и, в особенности, в процессах роста и клеточного размножения, хотя долгое время считалось, что они начинают действовать лишь в момент клеточного автолиза.

В работе представлены данные, иллюстрирующие их роль в дифференцировании активно размножающихся и неразмножающихся клеток.

Показаны некоторые особенности энергетических условий, активирующих внутриклеточные катепсины, при которых включение аминокислот в белки протекает интенсивно.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Влияние ацетил-фосфата на значение pH активизации трипсина.

Рис. 2. — Включение глицина C^{14} в белки гомо- и гетеротрансплантата опухольной ткани под влиянием ацетил-фосфата при PH = 5.

Ach — влияние ацетил-холина;

Acph — влияние ацетил-фосфата;

Ach + E — влияние ацетил-холина + эсерина;

Acph + E — влияние ацетил-фосфата-эсерина;

A — гомотрансплантат опухольной ткани;

B — гетеротрансплантат опухольной ткани.

Рис. 3. — Включение глицина C^{14} в белки гомо- и гетеротрансплантата опухольной ткани под влиянием ацетил-фосфата при pH = 7.

Рис. 4. — Включение глицина C^{14} в белки печени крыс под влиянием ацетилфосфата.

DONNÉES BIOCHIMIQUES SUR LA SIGNIFICATION DE L'ACTIVITÉ DES CATHEPSINES DES TISSUS CANCÉREUX ET NON CANCÉREUX

RÉSUMÉ

Les cathepsines intracellulaires, considérées depuis longtemps comme n'entrant en activité qu'au moment de l'autolyse cellulaire, peuvent participer d'une manière active à la vie de la cellule et notamment aux processus de croissance et de multiplication cellulaires.

On fournit des données démontrant leur rôle dans la différenciation des cellules à prolifération active d'avec les cellules non prolifératives.

On présente quelques aspects des conditions énergétiques qui activent les cathepsines intracellulaires, conditions dans lesquelles l'incorporation des acides aminés dans les protéines se produit d'une manière active.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Influence de l'acétylphosphate sur le pH d'activité de la trypsine.

Fig. 2. — Incorporation de la glycine ^{14}C dans les protéines de l'homo- et de l'hétérogreffe tumorale sous l'influence de l'acétylphosphate au pH 5.

Ach = Influence de l'acétylcholine ; Acph = influence de l'acétylphosphate ; Ach + E = = influence de l'acétylcholine + ésérine ; Acph + E = influence de l'acétylphosphate + ésérine ; A = homogreffe tumorale ; B = hétérogreffe tumorale.

Fig. 3. — Incorporation de la glycine ^{14}C dans les protéines de l'homo- et de l'hétérogreffe tumorale, sous l'influence de l'acétylphosphate au pH 7.

Fig. 4. — Incorporation de la glycine ^{14}C dans les protéines du foie de souris sous l'influence de l'acétylphosphate.

BIBLIOGRAFIE

1. F. E. LEHMAN, în *Advances in morphogenesis*. M. Abercrombie şi J. Brachet, Academie Press, New York — London, 1961, 153, **I**.
2. B SYLVÉN, H. MALMGREN, Acta radiol. Stockh., Suppl. 154 (1957).
3. G. BENZ, Oncologia, **12**, 128 (1959).
4. A. POPE, J. of nerophysiology, **15**, *2*, 115 (1952).
5. Н. Н. ДЕМИН, Изв. Акад. Наук, СССР, Серия Биология, *6*, 67 (1955).
6. O. COSTĂCHEL, I. KITULESCU, Revue des Sci. Médicales, **IV**, 19 (1959).
7. O. COSTĂCHEL, I. KITULESCU, N. VOICULET, I. POPP, Acta biologica et medica germanica, **5**, *3*, 187 (1960).
8. O. COSTĂCHEL, I. KITULESCU, N. VOICULET, Acta biologica et medica germanica, **5**, *3*, 187 (1960).
9. I. KITULESCU, V. BĂLUTĂ, G. DINESCU, Studii şi cercet. biochimie, **IV**, *1*, 87 (1961).
10. E. R. STADTMAN, în *Methods in enzymology*, S. P. Colowick şi N. O. Kaplan, Acad. Press, New York, 1955, **I**, 596.

VARIAȚIA NICOTINEI DIN FOILE DE TUTUN, PE ETAJE, SUB INFLUENȚA AZOTULUI DIN SOL

DE

N. ANIȚIA, C. ILLE și MARIA VOICULESCU

În biochimia plantei de tutun s-au făcut numeroase cercetări privind biogeneza nicotinei, rolul ei fiziologic, repartiția ei în diferite organe, formarea și acumularea ei în plantă. În această comunicare vom prezenta stadiul problemei și cîteva din rezultatele cercetărilor noastre privind variația nicotinei din foile plantei normale (necîrnite) de tutun, pe etaje. Precizăm aceasta, pentru că sînt deosebiri mari între conținutul de nicotină al unei plante normale, necîrnite, și acela al unei plante cîrnite, de la care s-a rupt inflorescența, operație ce se face uneori în scop industrial, pentru a se obține tutun de o anumită calitate.

În privința conținutului de nicotină al foilor de tutun din diferite etaje sînt contradicții ce durează de aproape 50 de ani, așa cum rezultă din tabela 1 în care dăm principalele rezultate obținute de diferiți autori.

Cei mai mulți autori arată că foile de vîrf au un procent mai mare de nicotină, care scade spre foile de bază. Printre cei mai vechi autori din această categorie sînt Chuard și Millet citați după [14], Piatnițki citat după [26] și Schlösing citați după [18], iar printre cei mai recenți P. Gisquet și H. Hitier [18], W. W. Garner [17], A. A. Șmuk [26], Koenig și A. Wenusch [30].

Destul de numeroși autori au date experimentale care arată însă tocmai contrariul și anume că foile de bază au procentul cel mai mare de nicotină și că acesta scade spre foile de vîrf. Aici pot fi menționați Boggesgaard-Rasmussen citat după [14], A. A. Șmuk [26] și I. Vlădescu [27]. Foarte recent (1961), H. B. Vickery [29] găsește același lucru la soiul de tutun Connecticut 49 1.7 D.

Unii autori, cum sînt Krevs și Piatnițki citat după [26] și H. Brückner [14], au găsit că foile de mijloc au procentul cel mai mare de nicotină și că acesta scade spre foile de bază și vîrf.

Pe baza datelor din literatură nu se poate face vreo corelație între tipul de tutun și variația nicotinei pe etaje. Un exemplu tipic este cel dat de I. Vlădescu [27], care găsește rezultate similare la două tipuri îndepărtate de tutun: oriental și pentru țigări-foi.

Cauza acestor contradicții trebuie căutată în condițiile diferite de mediu în care au crescut plantele. Noi ne-am propus să studiem influența

Tabela 1

Conținutul de nicotină în foile de tutun, pe etaje, după diferiți autori

Etajul cu mai multă nicotină	Anul	Autorii	Soiul de tutun	% de nicotină în foi de la		
				bază	mijloc	vîrf
Foi de vîrf	1912	Chuard și Millet	—	0,34	3,12	4,79
	1927	Piatnițki	Trapezund	1,71	2,26	2,44
	„	„	Samsun	1,72	2,29	2,38
	„	„	American	2,42	3,14	5,43
	1929	Schlösing	Pas de Calais	1,00	1,17	1,39
	1948	Șmuk	—	3,30	4,60	5,30
	1951	Gisquet și Hitier	Paraguay	1,90	2,20	2,50
Foi de mijloc	1916	Krevs	—	1,01	2,51	2,16
	1927	Piatnițki	Diubec	2,13	3,48	1,45
	1936	Brückner	Macedonia	1,187	1,596	1,368
Foi de bază	1915	Boggesgaard-Rasmussen	—	1,53	1,35	0,71
	1930	Șmuk	plante înflorite	1,68	1,05	0,56
	„	„	plante cu capsule	3,12	2,94	1,84
	1940	Vlădescu	Molovata	0,97	0,46	0,19
	„	„	Sătmărean	2,50	1,48	0,74

principalilor factori ai mediului, în special a celor de nutriție care pot determina aceste contradicții.

În cele ce urmează vom da cîteva rezultate privind influența variației azotului din sol asupra variației nicotinei din foile de tutun, pe etaje.

MATERIAL ȘI METODĂ

Experiențele s-au pus în casa de vegetație [6] — [13], utilizînd vase mari cu 15 kg amestec de pămînt și nisip. Amestecul avea 74,5% nisip, fiind deci de natură nisipo-argilos. Cantitatea de amestec dintr-un vas de vegetație avea 0,1 g azot.

S-au stabilit 9 variante de îngrășare cu azot, dat sub formă de azotat de amoniu și anume : 0,1 ; 0,25 ; 0,50 ; 1,0 ; 2,0 ; 4,0 ; 6,0 ; 8,0 ; și 10,0 g azot (N) la un vas de vegetație. Fiecare vas a mai primit cîte 2 g P_2O_5 sub formă de NaH_2PO_4 și cîte 2 g K_2O sub formă de K_2SO_4, precum și cîte 3 ml de soluție Scholtz pentru celelalte elemente citat după [16]. Apa s-a dat zilnic, prin cîntărire, și a fost menținută la 70 — 90% din capacitatea solului pentru apă. Fiecare variantă a avut patru vase-repetiții și în fiecare vas a crescut o plantă de tutun din soiul Bărăgan 230.

Foile au fost recoltate pe cele trei etaje (bază, mijloc, vîrf) pe măsură ce au ajuns la maturitatea industrială, apoi au fost supuse proceselor corespunzătoare de dospit și uscat, în condiții identice.

Determinarea nicotinei s-a făcut după metoda gravimetrică Bertrand și Javillier citat după [27], folosind ca reactiv acidul silicowolframic, și anume separat din fiecare plantă, pe cele trei etaje.

Valorificarea datelor experimentale s-a făcut după metoda analizei varianței [15], [22]. Fiecare din cele nouă serii de îngrășare cu azot s-a considerat cîte o experiență cu trei variante (foi de bază, de mijloc și de vîrf).

REZULTATE OBȚINUTE

În tabela 2 dăm valorile medii absolute ale conținutului de nicotină, exprimat în procente din substanța uscată, și conținutul relativ, luînd ca martor de comparație foile de bază. S-a stabilit diferența absolută a conți-

Tabela 2

Variația nicotinei din foile de tutun, pe etaje, sub influența azotului din sol
(% de nicotină din substanța uscată)

gN/ vas	Etajul foilor	Valori medii		Diferența		Gradul semnificației	Diferențe limite	
		% nicotină	relative	% nicotină	relativă		% nicotină	relativă
0,1	bază	0,4350	100	—	—	—	$DL_{5\%}$ = 0,0245	5,62
	mijloc	0,3050	70,1	−0,1300	29,9	0 0 0	$DL_{1\%}$ = 0,0371	8,53
	vîrf	0,2250	51,1	−0,2100	48,3	0 0 0	$DL_{0,1\%}$ = 0,0596	13,70
0,25	bază	0,4825	100	—	—	—	$DL_{5\%}$ = 0,1044	21,64
	mijloc	0,3475	72,0	−0,1350	28,0	0	$DL_{1\%}$ = 0,1580	32,75
	vîrf	0,2425	50,3	−0,2400	49,7	0 0	$DL_{0,1\%}$ = 0,2539	52,62
0,5	bază	0,6100	100	—	—	—	$DL_{5\%}$ = 0,0662	10,85
	mijloc	0,3900	63,9	−0,2200	36,1	0 0 0	$DL_{1\%}$ = 0,1002	16,43
	vîrf	0,2950	47,5	−0,3150	52,5	0 0 0	$DL_{0,1\%}$ = 0,1609	26,38
1,0	bază	0,6575	100	—	—	—	$DL_{5\%}$ = 0,0828	12,59
	mijloc	0,5475	83,3	−0,1100	16,7	0	$DL_{1\%}$ = 0,1254	19,07
	vîrf	0,2775	42,2	−0,3800	57,8	0 0 0	$DL_{0,1\%}$ = 0,2024	30,78
2,0	bază	0,9350	100	—	—	—	$DL_{5\%}$ = 0,0838	8,96
	mijloc	0,9450	101,1	+0,0100	1,1		$DL_{1\%}$ = 0,1269	13,57
	vîrf	0,5275	56,4	−0,4075	43,6	0 0 0	$DL_{0,1\%}$ = 0,2021	21,56
4,0	bază	1,1700	100	—	—	—	$DL_{5\%}$ = 0,0255	21,79
	mijloc	2,2900	195,7	+1,1200	95,7	× × ×	$DL_{1\%}$ = 0,0422	36,07
	vîrf	1,8933	161,8	+0,7233	61,8	× ×	$DL_{0,1\%}$ = 0,0790	67,52
6,0	bază	1,2875	100	—	—	—	$DL_{5\%}$ = 0,2136	16,59
	mijloc	2,5500	218,1	+1,2625	118,1	× × ×	$DL_{1\%}$ = 0,3254	25,12
	vîrf	2,8500	221,4	+1,5625	121,4	× × ×	$DL_{0,1\%}$ = 0,5196	40,35
8,0	bază	1,3525	100	—	—	—	$DL_{5\%}$ = 1,2375	91,48
	mijloc	2,7475	203,1	+1,3950	103,1	×	$DL_{1\%}$ = 1,8736	138,53
	vîrf	3,0550	225,9	+1,7025	125,9	×	$DL_{0,1\%}$ = 3,0098	222,54
10,0	bază	2,4925	100	—	—	—	$DL_{5\%}$ = 0,3014	12,09
	mijloc	3,0075	121,0	+0,5150	21,0	× ×	$DL_{1\%}$ = 0,4563	18,31
	vîrf	3,2525	131,5	+0,7600	31,5	× × ×	$DL_{0,1\%}$ = 0,7331	29,41

nutului de nicotină din foile de mijloc și de vîrf față de cele de bază (martor) și s-a exprimat această diferență și în procente (relativ) față de conținutul (procentual) de nicotină din foile de bază. S-au calculat apoi în fiecare experiență diferențele limită (DL) pentru probabilitatea de transgresiune (P) de 5, 1 și 0,1%, exprimîndu-le și în procente (relativ) din conținutul (procentual) de nicotină din foile de bază (martor). S-au comparat diferențele limită absolute și relative cu diferențele experimentale absolute și relative și s-a stabilit gradul de semnificație al diferențelor.

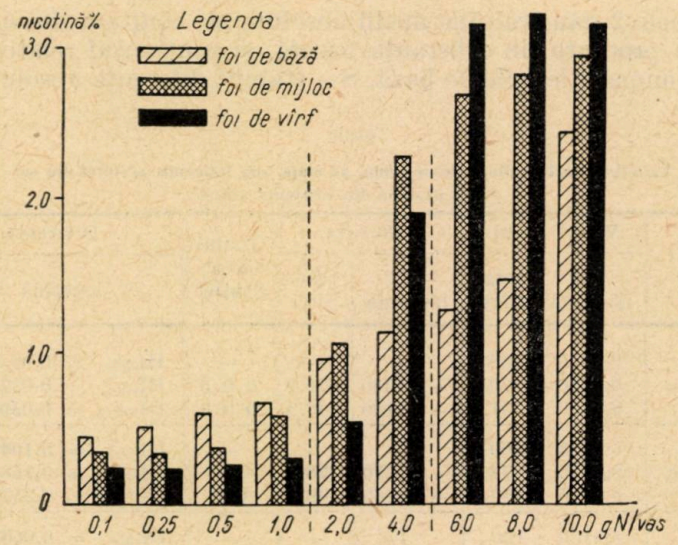


Fig. 1. — Variația nicotinei din foile de tutun pe etaje sub influența azotului din sol la solul Bărăgan 230.

Din examinarea rezultatelor (tabela 2 și fig. 1) se constată că acestea pot fi împărțite în trei categorii.

Din prima categorie fac parte primele patru serii, cu azot puțin în sol, și anume cu 0,1 ; 0,25 ; 0,50 și 1,0 g N/vas, unde conținutul cel mai mare de nicotină îl au foile de bază, care variază între 0,4350 și 0,6575% crescînd o dată cu doza de azot din sol.

Foile de mijloc au mai puțină nicotină, și anume 0,3050—0,5475% din substanța uscată, ceea ce reprezintă numai 63,9—83,3% față de foile de bază. Diferențele conținutului de nicotină sînt semnificative în seriile cu 0,25 și 1 g N/vas, probabilitatea de transgresiune (P) fiind cuprinsă între 1 și 5%. În seriile cu 0,1 și 0,5 g N/vas, diferențele între conținutul de nicotină din foile de mijloc față de cele de bază sînt foarte semnificative (P mai mic de 1%).

Foile de vîrf au conținutul cel mai mic de nicotină, variind între 0,2250 și 0,2775% din substanța uscată, ceea ce reprezintă aproximativ jumătate (42,2—51,1%) din conținutul de nicotină al foilor de bază. Diferențele conținutului de nicotină sînt foarte semnificative în trei serii,

și anume în cele cu 0,1 ; 0,50 și 1 g N/vas (P mai mic de 0,1%), iar în seria cu 0,25 g N/vas, diferența este distinct semnificativă (P între 0,1 și 1%).

Este de subliniat că diferențele între conținutul de nicotină al foilor de mijloc și al celor de vîrf sînt — în medie — asemănătoare și deci au grade de semnificație asemănătoare cu diferențele dintre foile de bază și cele de mijloc. În seria cu 1 g N/vas, diferența între foile de bază și cele de mijloc este cea mai mică din cele patru serii examinate, aceasta constituind o situație de tranziție spre categoria următoare.

A doua categorie cuprinde seriile cu cantitate mijlocie de azot în sol (2 și 4 g N/vas), unde conținutul cel mai mare de nicotină se găsește în foile de mijloc (0,9450—2,2900%) și scade spre foile de bază și de vîrf. În seria cu 2 g N/vas, diferența conținutului de nicotină între foile de mijloc și cele de bază (martor) este mică și nesemnificativă — situație de tranziție — în timp ce în seria cu 4 g N/vas această diferență este mare și foarte semnificativă.

Foile de vîrf, în seria cu 2 g N/vas, au conținutul cel mai mic de nicotină, cu o diferență foarte semnificativă față de foile de bază (martor). În seria cu 4 g N/vas foile de vîrf au un conținut mai mare de nicotină decît cele de bază, cu o diferență distinct semnificativă.

A treia categorie cuprinde seriile cu mult azot în sol (și anume de 6, 8 și 10 g N/vas), în care conținutul cel mai mare de nicotină se găsește în foile de vîrf (2,8500—3,2525%) și scade spre foile de bază. În foile de mijloc din seriile cu 6 și 8 g N/vas conținutul de nicotină este de două ori mai mare (203,1—218,1%) decît în foile de bază, în timp ce între foile de mijloc și cele de vîrf diferențele sînt mai apropiate, ca și în seria cu 10 g N/vas, la toate cele trei variante.

De subliniat că, în limitele condițiilor experimentale, procentul mediu de nicotină a fost de 0,3% în seria cu 0,1 g N/vas și a crescut la 3% în seria cu 10 g N/vas. Deci, în timp ce conținutul de azot din sol crește de 100 de ori (0,1—10), cel de nicotină crește numai de 10 ori (0,3—3%).

DISCUȚII

Confruntînd rezultatele noastre cu datele din literatură, se constată că noi am găsit una din cauzele care face să varieze procentul de nicotină din foile de tutun de diferite etaje, la plantele normale (necîrnite). Această cauză este variația azotului din sol.

Pentru a găsi o explicație a influenței variabile a azotului din sol asupra conținutului de nicotină din foile de diferite etaje, am făcut unele experiențe, pentru a verifica două ipoteze.

O primă ipoteză a fost aceea că la doze mici de azot în sol, planta a luat și folosit în cea mai mare parte azotul disponibil în prima parte a perioadei de vegetație, cînd s-au format foile de bază. Nicotina s-a putut deci sintetiza în cantitate mai mare în foile de bază. În a doua parte a

perioadei de vegetație a plantei, cînd s-au format foile de vîrf, a fost mai puțin azot în sol și s-a putut sintetiza mai puțină nicotină.

Pentru a verifica această ipoteză, am executat o experiență în care azotul a fost dat pe trei faze de vegetație, astfel ca și în faza a treia, cînd se formează foile de vîrf planta să aibă în sol aceeași cantitate de azot ca și în prima și a doua fază de vegetație. Rezultatele [13] nu au confirmat această ipoteză.

S-a mai studiat influența unor doze și mai mari de azot în sol (pînă la 20 g N/vas), apoi influența concentrației azotului din sol asupra variației nicotinei din foile diferitelor etaje de tutun [13]. Pe baza acestora — ca și pe baza rezultatelor din prezenta comunicare, — s-a întocmit diagrama din figura 2, cu generalizarea variației nicotinei din foile de tutun pe etaje la soiul Bărăgan 230, sub influența azotului din sol. Menționăm că generalizarea se referă la acest soi de tutun cu foaia mare, căci unele experiențe — în curs de executare — par să arate că soiurile de tutun cu foi mici (Molovata) și mijlocii (Ghimpați) s-ar comporta altfel decît soiul Bărăgan. S-ar putea astfel ca explicația amintită mai sus să fie dată de mărimea și suprafața foilor de tutun.

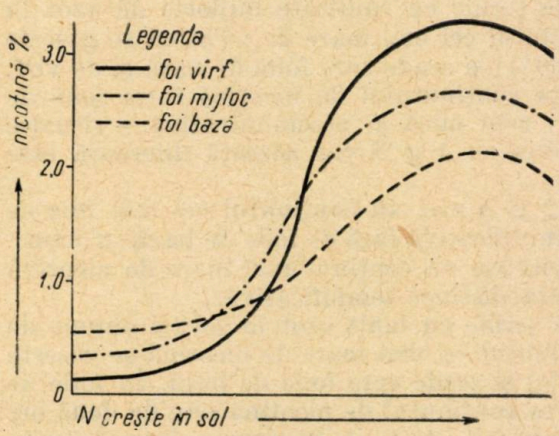


Fig. 2. — Generalizarea variației nicotinei din foile de tutun pe etaje sub influența azotului din sol.

Alte experiențe (încă nepublicate) arată că și alți factori de vegetație, cum sînt fosforul și apa din sol, determină variația nicotinei din foile de diferite etaje ale plantei de tutun. L. Schipfer [23] găsește același lucru pentru potasiu, iar F. Seehofer și colaboratori [24], într-un studiu recent, urmărește raportul dintre compoziția chimică a tutunului și factorul sintetic pedo-climatic.

Mai multe cercetări au arătat cît de mult este influențată compoziția chimică a tutunului de condițiile de mediu [4], [5], [6]. S-a studiat cu deosebire influența umidității din sol [1], [2], [7], a azotului [3], [8], [9], [11], [12] și a unor îngrășăminte fiziologic acide și alcaline [10] asupra compoziției chimice în general și a variației nicotinei în special. Avem cercetări în curs de executare, care lărgesc mult studiul influenței mediului asupra însușirilor fiziologice și caracterelor biochimice la tutun. Astfel lucrările noastre, ca și ale altora, dintre care citățm pe Iljin și Mothes citați după [12], [13], pe Mașcovțev [19,20], V. I. Olendschi și Balanda [21], L. Schipfer [23] și F. Seehofer [24], reprezintă o direcție nouă de cercetare, și anume aceea de a studia variația însușirilor fiziologice și biochimice la tutun sub influența variației factorilor de nutriție singulari și în complex, și mai larg sub influența condi-

țiilor de mediu. Această direcție de cercetare duce la stabilirea unor noi relații între fenomenele fiziologice și biochimice și între factorii de vegetație care le determină.

Prin aceasta se lămuresc numeroase contradicții dintre rezultatele cercetărilor din biochimia tutunului din ultimele decenii.

CONCLUZII

Din cercetările noastre rezultă că unul din factorii care determină variația conținutului de nicotină din foile de tutun de diferite etaje este azotul din sol.

La doze mici de azot în sol, conținutul cel mai mare de nicotină îl au foile de bază, de unde acesta scade spre foile de vîrf.

La doze mijlocii de azot în sol, conținutul cel mai mare de nicotină îl au foile de mijloc, iar de aici scade atît spre foile de bază, cît și spre cele de vîrf.

La doze mari de azot în sol, conținutul cel mai mare de nicotină îl au foile de vîrf, de unde scade spre cele de bază.

Amplitudinile de variație a conținutului de nicotină din foile de tutun, sub influența variației azotului din sol, sînt mici la foile de bază, mijlocii la foile de mijloc și foarte mari la foile de vîrf.

Tot complexul de relații arată că procentul de nicotină din foile de tutun crește o dată cu creșterea azotului din sol pînă la o anumită limită, iar la doze foarte mari de azot nicotina descrește în foi.

Prezentată la redacție la 5 februarie 1962

Institutul de cercetări alimentare, București

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НИКОТИНА В ЛИСТЬЯХ ТАБАКА НА РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПОЧВЕННОГО АЗОТА

РЕЗЮМЕ

Существуют многочисленные разногласия между различными авторами по вопросу об изменении процентного содержания никотина в листьях табака на различных уровнях нормальных невершкованных растений (таблица 1). Причиной этих разногласий являются различные условия, в которых выросли растения.

По мнение авторов, одним из факторов, вызывающих эти разногласия у сорта Бэрэган 230 является изменение содержания азота в почве. Исследования авторов привели к следующим выводам:

— при малых содержаниях азота в почве, максимальное количество никотина содержат нижние листья, а к верхушке растения это количество уменьшается;

— при средних содержаниях азота в почве, наибольшее количество никотина содержат средние листья, тогда как в нижних и верхних листьях оно снижено;

— при больших содержаниях азота в почве, больше всего никотина содержат верхние листья и меньше всего — нижние;

— все соотношения указывают на то, что содержание никотина в листьях возрастает параллельно содержанию азота в почве.

Другие исследования авторов показывают, что различные факторы (фосфор, калий, почвенная вода и т.д.) также вызывают изменение содержания никотина в различных органах табака и в листьях на различных уровнях растения.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Изменение содержания никотина в листьях табака на различных уровнях под влиянием почвенного азота для сорта Бэрэган 230.

Рис. 2. — Генерализация изменения никотина в листьях табака на различных уровнях под влиянием почвенного азота.

LA VARIATION DE LA NICOTINE DANS LES FEUILLES DE TABAC, PAR ÉTAGES, SOUS L'INFLUENCE DE L'AZOTE DU SOL

RÉSUMÉ

Il existe de nombreuses contradictions entre les différents auteurs (tableau 1) au sujet de la variation du pourcentage de la nicotine dans les feuilles de tabac de différents étages, chez les plantes normales non écimées. Ces contradictions s'expliquent par les conditions différentes de croissance des plantes.

Nous avons établi pour la variété Bărăgan 230 que l'un des facteurs qui détermine ces contradictions est la variation de l'azote du sol. Aussi, nos recherches montrent que :

— à de petites doses d'azote dans le sol, le pourcentage le plus élevé de nicotine se trouve dans les feuilles de la base, à partir desquelles il diminue vers les feuilles du sommet;

— à des doses moyennes d'azote dans le sol, le pourcentage le plus élevé de nicotine se trouve dans les feuilles du milieu de la tige, à partir desquelles il diminue tant vers les feuilles de la base que vers celles du sommet;

— à de grandes doses d'azote dans le sol, le pourcentage le plus élevé de nicotine se trouve dans les feuilles du sommet, à partir desquelles il diminue vers les feuilles de la base;

— tout le complexe de relations montre que le pourcentage de nicotine dans les feuilles de tabac augmente en rapport avec la teneur en azote du sol.

Une autre série de recherches que nous avons effectuées, montrent que d'autres facteurs (phosphore, potassium, eau du sol) déterminent également une variation du pourcentage de nicotine dans les différents organes de la plante de tabac, tout comme dans les différents étages des feuilles.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Variation de la nicotine dans les feuilles de tabac, par étages, sous l'influence de l'azote du sol, chez la variété Bărăgan 230.

Fig. 2. — Généralisation de la variation de la nicotine dans les feuilles de tabac, par étages, sous l'influence de l'azote du sol.

BIBLIOGRAFIE

1. ANITIA N., *Contribuțiuni la studiul influenței factorului de vegetație umiditate, asupra producției și calității tutunului.* Bul. tutun, *1—4*, 1—127 (1948).
2. ANITIA N., *Contribuțiuni la studiul factorilor care determină acumularea nicotinei în tutun.* Bul. tutun, *1—4*, 3—52 (1949).
3. ANITIA N., DIMOFTE N., *Cîrnitul tutunului în funcție de azotul și apa din sol.* Bul. tutun, *1—4*, 22—57 (1950).
4. ANITIA N., ILLE C., *Variația compoziției chimice la tutun.* Bibl. tehn. ICA, 1954.
5. ANITIA N., ILLE C., *Variația caracterelor morfologice și biochimice la tutun sub influența mediului.* Lucrările ICA, **II**, 307—318 (1958).
6. ANITIA N., ILLE C., *La variation de la nicotine sous l'influence du milieu dans les cultivars roumains de tabac.* Actes du II-ème Congrès Scientifique International du tabac, Bruxelles, 1958, 357—363.
7. ANITIA N., ILLE C., *Recherches concernant l'influence de l'humidité du sol sur le tabac.* Actes du II-ème Congrès Scientifique International du Tabac, Bruxelles, 1958.
8. ANITIA N., ILLE C., *Cercetări privind influența azotului asupra tutunului.* Lucrările ICA, **IV**, 173—186 (1959).
9. ANITIA N., ILLE C., *La variation de la composition chimique du tabac Gimpați sous l'influence de l'azote du sol.* Symposium Sci. Int. du Tabac, Istanbul, 1960, Bul. Inf. Coresta, Paris, *1*, 36—53 (1961).
10. ANITIA N., ILLE C., *L'influence des engrais acides et alcalins sur le tabac.* Symposium Sci. Int. du Tabac, Istanbul, 1960, Bul. Inf. Coresta, Paris, *1*, 24—35 (1961).
11. АНИЦИЯ Н., ИЛЛЕ К., ВОЙКУЛЕСКУ М., *Влияние азота из почвы на количество никотина в табаке*, Табак, Москва, **I**, 1961.
12. ANITIA N., ILLE C., VOICULESCU M., *Variația compoziției chimice a foilor de tutun pe etaje la soiul Bărăgan 230 sub influența azotului în sol (exp. 1959).* Lucrările ICA, **5**, 1961.
13. ANITIA N., ILLE C., VOICULESCU M., *Cercetări privind influența azotului din sol asupra variației nicotinei din foile de tutun pe etaje la soiul Bărăgan 230 (exp. 1960).* Comunicări de botanică, 1962.
14. BRÜCKNER H., *Die Biochemie des Tabaks.* Berlin, 1936.
15. CEAPOIU N., ȚOAFĂ E., *Elemente de tehnică experimentală agricolă. Partea I.* Acad. R.P.R., ICAR, 1959.
16. DAVIDESCU D., *Agrochimia*, București, 1956.
17. GARNER W. W., *The Production of Tobacco.* Philadelphia, 1947.
18. GISQUET P., HITIER H., *La production du Tabac.* Paris, 1951.
19. МАШКОВЦЕВ М. Ф., *Влияние влажности почвы на накопление никотина в табачном растении.* Сборник научно-исследовательских работ ВИТИМ, Краснодар, *151*.
20. МАШКОВЦЕВ, М. Ф., КОРЖИНА А. Н, *Влияние азотного питания на накопление никотина в табачном растении.* Агробиология, 6, 84—94 (1958).

21. ОЛЕНДСКИЙ В. И., БАЛАНДА Д. В., *Об азотном питании табака*, Сборник научно-исследовательских работ ВИТИМ, Краснодар, *150*.
22. SĂULESCU N., *Cîmpul de experiență*. Ed. agro-silvică, 1959.
23. SCHIPFER L., *Untersuchungen über den Einfluss gesteigerter und gestaffelter Kalidüngung auf den Ertrag in die Qualität des Tabaks.* (*Inaug. Diss.*) Fachl. Litteil. des Oester. Tabak-regie, *3*, 1959.
24. SEEHOFER F., THRAN P., CARSTENS H., *On the influence of environmental factors on the chemistry of tabacco*. Bul. Inf. Coresta, *1*, 148—156 (1961).
25. SMIRNOV A. I., *Biochimie des Tabaks*. Haag, 1940.
26. ШМУК А. А., *Химия табака и махорки*. Москва, 1948.
27. VLĂDESCU I., *Studiul repartiției substanțelor în planta de tutun. III. Nicotina*. Bul. tutun, *2*, 153—179 (1940).
28. VLĂDESCU I., *Dozarea nicotinei*. Bul. tutun, *4* (1936).
29. VICKERY H. B., *Chemical investigations of the tabacco plant. XI. Composition as a function of leaf position*. Conn. Agric. Exp. Sta., 1961, Bull., *640*, 43 ; Rec. Bul., Coresta, *3*, 45 (1961).
30. WENUSCH A., *Chemie des Tabakblattes*. Bremen, 1940.

CÎTEVA ASPECTE ALE METABOLISMULUI ACIDULUI ASCORBIC LA SOLANACEE

DE

GEORGETA ENĂCHESCU

Pentru interpretarea rezultatelor obținute la hibridările între specii de solanacee sau pentru caracterizarea biochimică a heterozisului sînt necesare cît mai multe criterii. În lucrări efectuate pînă în prezent [1], [4], [10], determinarea conținutului în acid ascorbic în fructele hibrizilor de tomate care manifestă fenomenul de heterozis s-a dovedit utilă. Acest fapt sugerează posibilitatea de a găsi în cazul de mai sus modificări și cu privire la factorii biochimici care participă direct sau indirect la metabolismul acidului ascorbic, cum ar fi glutationul, ascorbinaza [3], [6], [7], [8], polifenoloxidaza și peroxidaza [2], [5].

În lucrarea de față s-a urmărit în ce măsură ardeii, pătlăgelele vinete și tomatele, foarte diferite prin conținutul în acid ascorbic al fructelor, sau hibrizii de tomate în F_1 care manifestă fenomenul de heterozis se deosebesc cu privire la prezența sau evoluția factorilor biochimici amintiți.

MATERIAL ȘI METODĂ DE LUCRU

S-au luat în studiu în anul 1960 cîte un soi de ardei și de pătlăgele vinete, iar dintre tomate hibridul nr. 10 × Bizon în F_1, care manifestă puternic fenomenul de heterozis, precum și soiurile parentale nr. 10 și Bizon, cultivate la Stațiunea experimentală ICHV — Băneasa — București, pe sol brun-roșcat. S-au analizat frunzele plantelor, începînd de la înflorire pînă la coacerea primelor fructe, precum și fructele, înainte de coacere și la coacere. S-a determinat conținutul în substanță uscată (etuvă 105°C), în acid ascorbic (cu 2,6-diclorfenolindofenol), în glutation formă redusă și oxidată (prin metoda iodometrică), precum și activitatea ascorbinazei, polifenoloxidazei și peroxidazei (după K. Povoloțkaia și D. Sedenko [9].

REZULTATELE OBȚINUTE ȘI INTERPRETAREA LOR

Din rezultatele obținute, care în parte sînt înscrise în figura 1, s-a constatat că ardeii și pătlăgelele vinete au prezentat, comparativ cu tomatele, mai multă substanță uscată, atît în frunze cît și în fructe.

Conținutul în acid ascorbic al frunzelor de ardei a fost de două-trei ori mai mare decît acela al frunzelor de tomate și de pătlăgele vinete. O deosebire mare între cele trei specii s-a remarcat și în ceea ce privește conținutul în acid ascorbic al fructelor. Acesta este foarte ridicat, după cum se știe, la ardei (70—230 mg% g) și aproape inexistent la pătlăgelele vinete (0,5—4 mg % g) (fig. 1, A_1 și A_2). Tomatele au ocupat un loc intermediar (18—36 mg % g). În perioada urmărită, pe măsură ce plantele s-au apropiat de fructificare, conținutul în acid ascorbic al frunzelor de ardei și pătlăgele vinete a scăzut, iar la tomate a crescut. Față de acumularea sporită a acidului ascorbic în fructele de tomate și de ardei la coacere, în cazul pătlăgelelor vinete cele mai mari cantități de acid ascorbic s-au întîlnit în fructele necoapte. Acest fapt sugerează existența unor diferențe mari în metabolismul acidului ascorbic, în fructele speciei din urmă, față de primele.

Conținutul cel mai ridicat în forma redusă a glutationului l-au prezentat frunzele și fructele de ardei, iar cel mai mic frunzele și fructele de tomate și fructele de pătlăgele vinete.

Privitor la valorile raportului dintre conținutul în acid ascorbic și acela în glutation din frunze, cele trei specii s-au deosebit mai mult în faza de creștere și dezvoltare mai înaintată a plantelor, și anume la coacerea fructelor; în această fază tomatele au prezentat cele mai mari valori, iar pătlăgelele vinete pe cele mai mici (fig. 1, B_1 și B_2). În fructele de ardei atît necoapte cît și coapte, s-a găsit cel mai mic conținut în glutation față de conținutul în acid ascorbic, iar la pătlăgelele vinete cel mai mare. Forma oxidată a glutationului nu a putut fi sesizată însă în nici un caz prin metoda folosită.

Activitatea ascorbinazei a fost în general mai intensă în cazul pătlăgelelor vinete, atît în frunze cît și în fructe, și mai redusă la ardei (fig. 1, C_1 și C_2). La tomate, în apropierea coacerii fructelor din primul etaj ascorbinaza și-a intensificat puternic activitatea în frunze, fapt care a coincis cu valorile mari ale raportului dintre conținutul în acid ascorbic, și glutation și ale conținutului în substanță uscată din frunze, corespunzătoare acestei faze.

În cazul ardeilor și al pătlăgelelor vinete s-a constatat o corelație negativă între nivelul conținutului în acid ascorbic și intensitatea activității ascorbinazei, atît în frunze cît și în fructe. Prin urmare, conținutul ridicat în acid ascorbic al unui țesut nu implică existența unei ascorbinaze active. La maturitatea de consum, tomatele s-au evidențiat, ca și ardeii, printr-o activitate practic inexistentă a ascorbinazei. Acest fapt poate fi pus în legătură cu oxidarea mai lentă a acidului ascorbic, atît în fructele întregi, puse la păstrare, ale celor două specii, cît și în țesutul mărunțit al fructelor. Invers decît la ardei, frunzele pătlăgelelor vinete și ale toma-

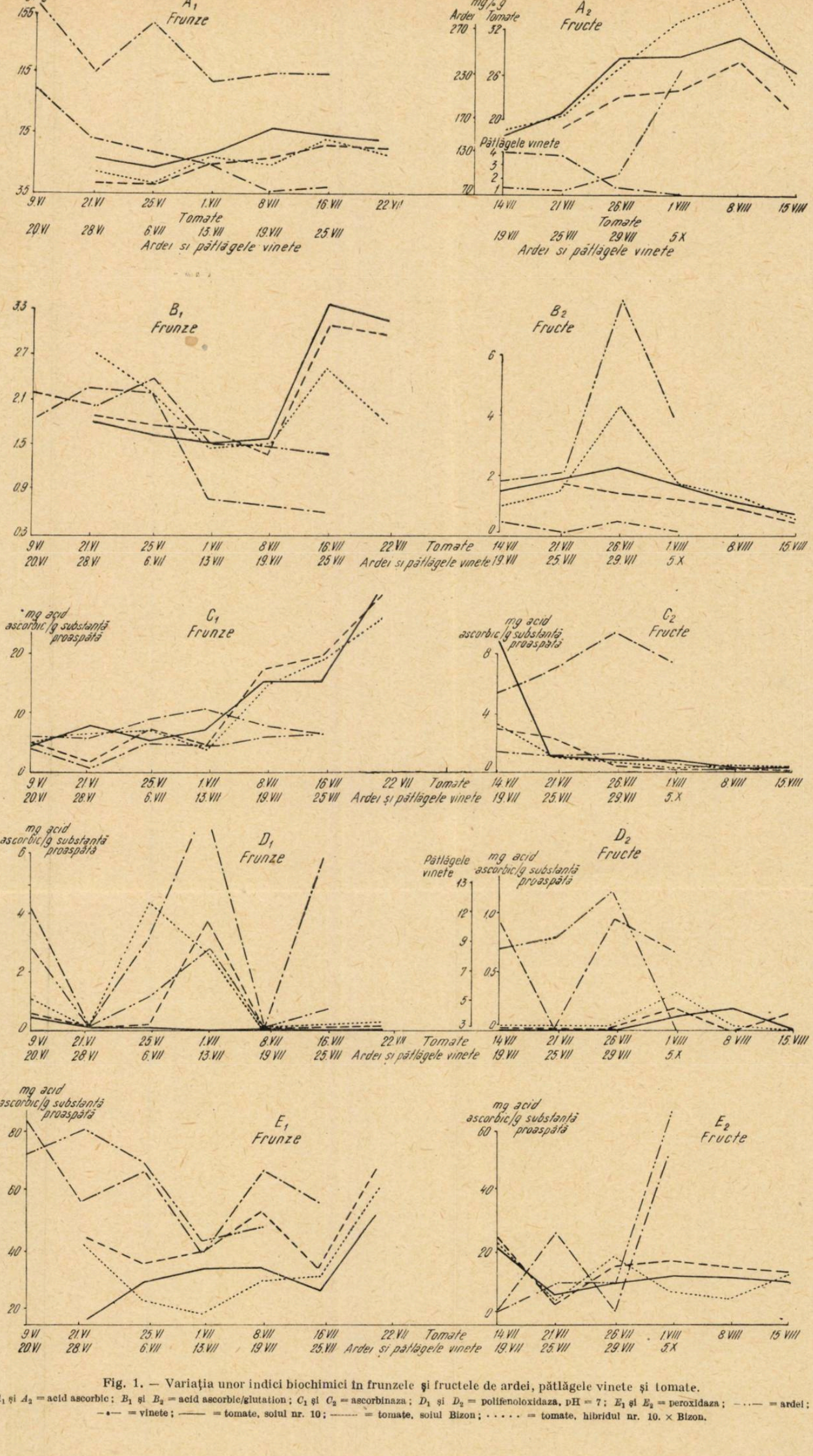


Fig. 1. — Variația unor indici biochimici în frunzele și fructele de ardei, pătlăgele vinete și tomate.

A_1 și A_2 = acid ascorbic; B_1 și B_2 = acid ascorbic/glutation; C_1 și C_2 = ascorbinaza; D_1 și D_2 = polifenoloxidaza, pH = 7; E_1 și E_2 = peroxidaza; —·—·— = ardei; —•— = vinete; ——— = tomate, soiul nr. 10; - - - - - = tomate, soiul Bizon; · · · · · = tomate, hibridul nr. 10. × Bizon.

telor sau fructele de pătlăgele vinete au prezentat o capacitate mare de a oxida acidul ascorbic la pH = 7, la care ascorbinaza este aproape inactivă. Aceasta se datorește probabil altor enzime, care oxidează nespecific acidul ascorbic, prin intermediul unor substanțe pe care cele două specii le posedă în măsură mai mare decît ardeii.

Din felul în care s-a comportat activitatea ascorbinazei în frunzele și fructele speciilor studiate rezultă că această enzimă este angajată în special în țesuturile cu o activitate intensă de sinteză.

Activitatea polifenoloxidazei, atît la pH = 5 cît și la pH = 7, a fost mai pronunțată în frunzele și fructele pătlăgelelor vinete și mult mai mică în frunzele și fructele de ardei și tomate (fig. 1, D_1 și D_2).

Peroxidaza a prezentat o activitate mai mare — și asemănătoare ca evoluție — în frunzele de ardei și de pătlăgele vinete (fig. 1, E_1 și E_2). În frunzele tomatelor, invers decît la ardei și la pătlăgelele vinete, peroxidaza a fost mai activă cu cît plantele s-au apropiat de fructificare; de asemenea ea a fost mai activă în fructele necoapte, față de cele ajunse la maturitatea de consum. S-a mai constatat apoi o corelație negativă între activitatea polifenoloxidazei la pH = 7 și a peroxidazei, în frunzele și fructele de ardei și pătlăgele vinete, ca și cum cele două enzime s-ar fi înlocuit reciproc. În general, la toate speciile studiate, atît în frunze cît și în fructe, mai intens a activat peroxidaza și mai puțin intens polifenoloxidaza.

La ardei, cantitățile mari de acid ascorbic din fructe, în special, constituie probabil o rezervă din care numai o mică parte intră în diferitele cicluri de oxidoreducție. Existența acestei rezerve este poate în legătură cu slaba activitate a enzimelor care oxidează în general direct sau indirect acidul ascorbic, și desigur și cu lipsa substanțelor intermediare de oxidare. Proporția mare de glutation față de acidul ascorbic prezent în frunzele și fructele de pătlăgele vinete poate să fie consecința capacității mari de oxidare a țesuturilor respective.

Din cele arătate rezultă că ardeii, tomatele și pătlăgelele vinete se deosebesc net cu privire la factorii biochimici cercetați și că urmărirea acestora ar putea fi de folos pentru studiul hibridării între cele trei specii.

Diferențele între soiurile de tomate nr. 10 și Bizon, așa cum rezultă din graficele amintite, au constat numai în conținutul mai ridicat în substanță uscată și acid ascorbic al frunzelor și fructelor din soiul nr. 10 și în activitățile polifenoloxidazei la pH = 7 și a peroxidazei, mai mari la soiul Bizon, în special în frunze. Cum aceste soiuri sînt foarte diferite ca vegetație, port, precocitate, dimensiuni și compoziție chimică a fructelor, rezultă că, în general, în evoluția factorilor biochimici urmăriți nu s-au reflectat caracterele de mai sus. Comparativ cu genitorii, în frunzele hibridului nr. 10 × Bizon a existat mai puțină substanță uscată, probabil ca o consecință a dezvoltării sale vegetative puternice, dar s-a constatat o activitate mai puternică a polifenoloxidazei la pH = 7 și, atît în frunze cît și în fructe, o evoluție foarte diferită a raportului dintre conținutul în acid ascorbic și glutation. În fructele coapte ale hibridului nr. 10 × Bizon s-a găsit mai mult acid ascorbic decît în fructele genitorilor. Aceste modificări pot fi datorate fenomenului de heterozis.

CONCLUZII

Din studiul variației conținutului în acid ascorbic și a unor factori biochimici cu acțiune directă sau indirectă în metabolismul acestuia, la ardei, tomate și pătlăgele vinete, s-au constatat următoarele :

— Pătlăgelele vinete, ardeii și tomatele se deosebesc mult cu privire la conținutul în acid ascorbic, glutation, activitățile ascorbinazei, polifenoloxidazei și peroxidazei, atît în frunze cît și în fructe. Urmărirea acestor factori biochimici ar fi de folos în studiul hibridării vegetative sau sexuate între cele trei specii.

— În cazul ardeilor și pătlăgelelor vinete a existat o corelație inversă între conținutul în acid ascorbic și activitatea ascorbinazei.

— Soiuri de tomate foarte diferite privitor la caracterele biologice s-au deosebit numai prin conținutul în acid ascorbic, activitățile polifenoloxidazei și peroxidazei.

— Hibridul nr. 10 × Bizon s-a deosebit față de genitori prin activitatea polifenoloxidazei, proporția de glutation redus față de conținutul în acid ascorbic și prin conținutul mai ridicat în acid ascorbic al fructelor coapte. Aceste modificări pot fi în legătură cu fenomenul de heterozis.

Prezentată la redacție la 5 februarie 1962

Institutul de cercetări horti-viticole

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ У ПАСЛЕНОВЫХ

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе автор исследовал во время цветения и плодоношения изменение содержания аскорбиновой кислоты, и ряда биохимических показателей в перцах, баклажанах, а также в гибриде томатов № 10 × Бизон, у которых отмечается явление гетерозиса, и в растениях, примененных для этой гибридизации.

Было констатировано, что баклажаны, перцы и томаты сильно различаются по содержанию аскорбиновой кислоты, глутатиона, по значениям активности аскорбинозы, полифенолоксидазы и пероксидазы как в листьях, так и в плодах.

Выявление этих биохимических показателей можно использовать при исследовании вегетативной или половой гибридизации трех указанных видов.

У перцев и баклажан существовала обратная зависимость между содержанием аскорбиновой кислоты и активностью аскорбиназы.

Сорта томатов № 10 и Бизон, весьма различные по своим биологическим характеристикам, различались лишь по содержанию аскорбиновой кислоты и по активностям полифенолоксидазы и пероксидазы.

По сравнению с растениями, примененными Для, гибридизации, гибрид № 10 × Бизон выявляет большую активность полифенолоксидазы, различные изменения отношения между содержанием аскорбиновой кислоты и глутатиона, а также более высокое содержание аскорбиновой кислоты в зрелых плодах.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Изменение некоторых показателей в листьях и плодах перцев, баклажан и томатов. A_1 и A_2 — аскорбиновая кислота; B_1 и B_2 — аскорбиновая кислота (глутатион); C_1 и C_2 — аскорбиноза; D_1 и D_2 — полифенолоксидаза при pH = 7; E_1 и E_2 — пероксидаза; — ·· — перцы; — · — балклажаны; ---- томаты, сорт № 10; – – – – томаты сорт Бизон; ····· томаты, гибрид № 10 × Бизон.

ASPECTS DU MÉTABOLISME DE L'ACIDE ASCORBIQUE CHEZ LES SOLANACÉES

RÉSUMÉ

Dans le présent travail, on a étudié la variation de la teneur en acide ascorbique et de certains indices biochimiques chez le piment, l'aubergine, l'hybride de tomate N° 10 × Bizon, qui manifestent le phénomène d'hétérosis , ainsi que chez les géniteurs de ce dernier, au cours d'une période comprise entre la floraison et la fructification.

Il a été établi que l'aubergine, le piment et la tomate diffèrent sensiblement en ce qui concerne la teneur en acide ascorbique, glutathion, les activités de l'ascorbinase, de la polyphénoloxydase et de la peroxydase tant dans les feuilles que dans les fruits.

L'observation de ces indices biochimiques pourrait être utile dans l'étude de l'hybridation végétative ou sexuée entre les trois espèces.

Chez le piment et l'aubergine on a costaté l'existence d'une corrélation inverse entre la teneur en acide ascorbique et l'activité de l'ascorbinase.

Les variétés de tomate N° 10 et Bizon, très dissemblables par leurs caractères biologiques, n'ont différé que par la teneur en acide ascorbique et les activités de la polyphénoloxydase et de la peroxydase.

Comparativement aux géniteurs, l'hybride N° 10 × Bizon a présenté une plus forte activité de la polyphénoloxydase, une évolution différente du rapport entre la teneur en acide ascorbique et glutathion et une teneur plus élevée en acide ascorbique, chez les fruits mûrs.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Variations de certains indices biochimiques dans les feuilles et les fruits de piment, d'aubergine et de tomate. A_1 et A_2 = Acide ascorbique ; B_1 et B_2 = acide ascorbique/glutathion ; C_1 et C_2 = ascorbinase ; D_1 et D_2 = polyphénoloxydase pH 7 ; E_1 et E_2 = perioxydase ; — ·· — = piment ; — · — = aubergine ; — = tomate, variété N° 10 ; - - - - = tomate, variété Bizon ; · · · · = tomate, hybride N° 10 x Bizon.

BIBLIOGRAFIE

1. ANDRONICESCU D., ENĂCHESCU G., TĂLPĂLARU E., *Contribuții la studiul fenomenului de heterozis la tomate.* Probleme actuale de biologie și științe agricole. Ed. Acad. R.P.R., București, 1960.
2. CASTANEDA-AGULLO M., HUERTO L., *Ascorbic acid, peroxidase and the protease in the latex of Pileus mexicanus.* Arch. of Bioch., **11**, *3*, 537 (1946).
3. FRANKE W., *Das Vitamin C in Pflanze und Tier.* Zeitschr. f. Lebensmittelunters, und Forsch, **112**, *1* (1960).
4. GUSEV P., GUSEVA A., *Heterosis in tomatoes and its use in the condition of the extreme north.* Pl. breed. abstr., *4*, 834 (1960).
5. GUTAMANIS K., *Influența luminii artificiale asupra compoziției biochimice a tomatelor.* Rev. Ref. Biolog., *4* 132 (1960).
6. KERTESZ Z., *Observation on the system ascorbic acid — glutathione-ascorbic acid oxidase.* Biochem. Journal, **32**, 621 (1938).
7. MAPSON L., GODDARD D., *Die Reduktion von Glutathion durch pflanzliches Gewebe.* Zeitschrf. Lebensmittelunters. und Forsch., **94**, *4*, 266 (1952).
8. MAPSON L., MOUSTAFA E., *Ascorbic acid and glutathione as respiratory carriers in the respiration of pea seedling.* Bioch. Journal, **62**, *2*, 248 (1956).
9. POVOLOTKAIA K., SEDENKO D., *Metod sovmestnogo opredeleniia aktivnosti askorbinoxidazî, polifenoloxidazî i peroxidazî.* Biohimiia, **20**, *1* (1955).
10. SIVRINA N., *Inheritance of chemical characters in tomatoes.* Pl. breed. abstr., *2*, 241 (1956).

STUDII BIOCHIMICE ASUPRA PROCESULUI DE RADIOPROTECȚIE

DE

M. FURNICĂ și G. FURNICĂ

Radiațiile emise de către substanțele radioactive pot acționa asupra organismului uman, provocînd numeroase tulburări ale proceselor biochimice normale. Aceste tulburări determină afecțiuni complexe care, însumate, se manifestă sub forma „maladiei actinice". Ca problemă de actualitate pentru radiobiologie este studiul posibilităților de a mări rezistența țesuturilor din organism la acțiunea radiațiilor și, în consecință, de a ridica rezistența întregului organism.

Numeroasele cercetări efectuate asupra efectelor radiobiologice provocate de către radiații ne-au condus la gruparea lor în două categorii mari : efecte radiobiologice directe, care cuprind acțiunea fizico-chimică directă și indirectă a radiațiilor asupra țesuturilor din organism, și efecte radiobiologice indirecte care cuprind și răspunsul sistemelor integratoare din organism (sistemul nervos, aparatul endocrin, aparatul hematoformator, țesutul reticulo-histocitar etc.) [1]—[3].

Determinată de aspectul amintit, problema actinoprotecției trebuie să fie studiată și rezolvată în strînsă legătură cu acțiunea complexă a radiațiilor asupra organismului. În acest sens O. Costăchel și colaboratori admit o actinoprotecție împotriva efectului direct și în al doilea rînd o actinoprotecție împotriva efectului indirect radiobiologic.

Faptul că nu s-a progresat rapid și cu rezultate spectaculoase în domeniul actinoprotecției se datorește unilateralității cercetărilor efectuate. În intenția de a aduce noi contribuții la rezolvarea problemei susmenționate, ne-am propus să studiem rolul sistemului nervos în actinoprotecție și să stabilim aproximativ contribuția actinoprotecției directe și indirecte la realizarea protecției întregului organism. În acest sens s-au experimentat pe animale supuse acțiunii radiațiilor radioactive compușii chimici protectori citați în literatură și, în paralel, s-au utilizat și compuși care acționează în mod specific asupra sistemului nervos. Eficacitatea radioprotectoare a compușilor amintiți a fost determinată prin testul de letalitate și de leucopenie [4].

Pentru a stabili rolul actinoprotecţiei directe sau indirecte, aceşti compuşi au fost experimentaţi şi pe polielectroliţi macromoleculari sintetici, cu proprietăţi asemănătoare polielectroliţilor din organism. Cu această ocazie s-a cercetat eficacitatea protectoare a compuşilor respectivi împotriva efectului hidroxilant al radiaţiiilor, în care caz acţiunea sistemului nervos era complet suprimată [5].

Mecanismul de actinoprotecţie al unor substanţe chimice este interpretat prin diverse ipoteze, fără ca fiecare luată separat, să poată corespunde întregului material experimental cunoscut. Limitarea ipotezelor enunţate se referă şi la faptul că pentru fiecare compus chimic se consideră un anumit mecanism limitat de acţiune, ca de exemplu acţiunea hipoxiantă în celule, acţiunea de blocare a radicalilor radiolitici din soluţie sau blocarea funcţiunilor organice radiosensibile ale macromoleculelor biologice. O serie din cercetările noastre au stabilit existenţa unei protecţii specifice de organ, legată de modificările biochimice de la nivelul ţesutului respectiv. O parte a cercetărilor au avut ca obiectiv verificarea ipotezei emise de O. Costăchel asupra rolului sistemului nervos şi endocrin în realizarea actinoprotecţiei. Sub acest raport am efectuat o serie de cercetări biochimice în legătură cu influenţa compuşilor radioprotectori asupra consumului de oxigen tisular, asupra conţinutului de acizi nucleici şi peroxizi din ţesuturile radiosensibile şi radiorezistente, cît şi asupra activităţii colinesterazice. Aceste cercetări au avut în vedere influenţa compuşilor radioprotectori asupra organismului iradiat sau neiradiat, asupra ţesuturilor *in vitro* şi *in vivo*, cu scopul de a aduce noi precizări în legătură cu mecanismul de actinoprotecţie. Cercetările s-au efectuat pe animale de laborator, şoareci sau şobolani albi, folosindu-se ca substanţe radioprotectoare cisteină, cisteamină, cistamină, AET, clorpromazină, 5-hidroxitriptamină (serotonină), cloraloză şi 2-propiltiazolidină.

REZULTATE

Acţiunea radioprotectorilor asupra letalităţii şi a leucogramei şobolanilor iradiaţi. Cercetări preliminare efectuate pe şobolani iradiaţi cu 1000 şi 1400 R şi protejaţi cu AET, largactil sau cu ambii compuşi au pus în evidenţă faptul că inhibiţia sistemului nervos îmbunătăţeşte considerabil gradul de protecţie conferit de AET (tabela 1) [4], [6].

Tabela 1

Protecţia împotriva acţiunii letale a radiaţiilor
(experienţă efectuată pe şobolani)

Substanţa radioprotectoare	Doza mg/kg corp	Doza de iradiere R	% animale supravieţuitoare		
			10 zile	20 zile	30 zile
Ser fiziologic	—	1 000	50	0	0
AET	250	1 000	100	95	90
Largactil	5	1 000	80	60	50
AET	250	1 400	80	40	30
Largactil	5	1 400	50	30	10
Largactil + AET	5 + 250	1 400	80	65	60

Rezultate asemănătoare se observă și în variațiile numărului de leucocite după iradiere : după iradierea șobolanilor cu doze de 500 R, leucocitele scad în ziua a 3-a, cresc după 7 zile fără a atinge valoarea normală și nu se refac nici după 18 zile ; la lotul iradiat sub protecție de AET, începînd din ziua a 7-a numărul de leucocite crește ; la lotul iradiat sub protecție de largactil + AET, după 12 zile de la începutul experienței se constată revenirea numărului de leucocite la valoarea normală (fig. 1).

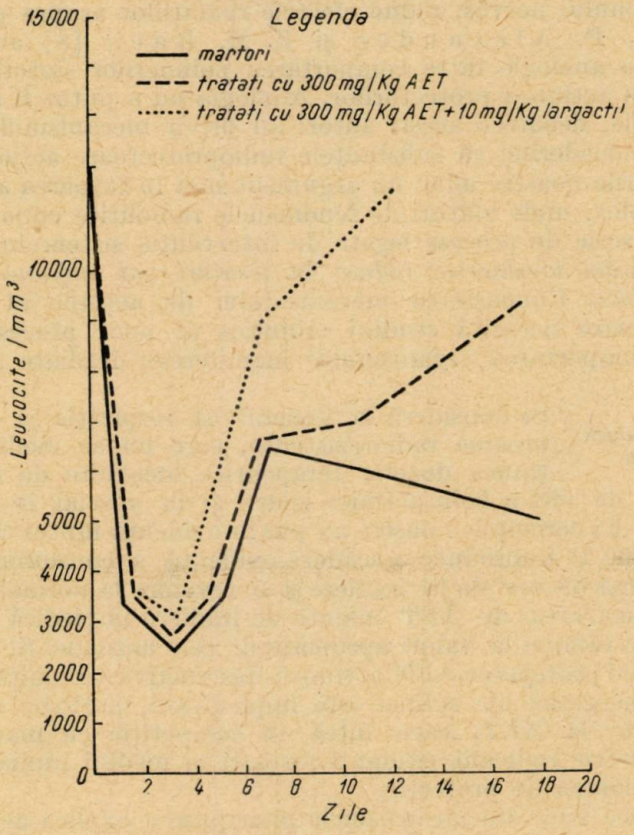


Fig. 1

Aceste date demonstrează că asocierea substanțelor chimice cu un compus ce se adresează sistemului nervos ridică eficacitatea de actinoprotecție a AET-ului și confirmă lucrările efectuate de O. Costăchel și colaboratori, prin care s-a demonstrat că inhibarea sistemului nervos în timpul iradierii induce un fenomen de radiorezistență la acțiunea radiațiilor [7].

Eficacitatea radioprotectorilor la iradierea polielectroliților macromoleculari sintetici. În vederea stabilirii gradului de participare al actinoprotecției directe, s-au experimentat cîteva substanțe pentru protejarea

polielectroliților macromoleculari sintetici împotriva acțiunii hidroxilante și degradante a radiațiilor [5].

Iradiindu-se rășini polifenolsulfonice în stare uscată sau de imbibiție hidrică, se constată în primul caz degradarea polimerului, iar în al doilea caz hidroxilarea lui. Iradierea rășinilor în prezență de cisteamină sau AET reduce efectul radiațiilor cu maximum 70%. Acest fapt demonstrează că mecanismul de protecție are la bază o reacție chimică.

Protectori de tipul α-cloralozei, care acționează în mod specific asupra sistemului nervos, reduc efectele radiațiilor asupra polimerilor cu maxim 30% P. Alexander și Z. M. Bacq [8] au încercat să stabilească o analogie între comportarea polimerilor sintetici și a organismului sub acțiunea protectorilor. Analogia nu a putut fi confirmată în toate cazurile, deoarece acești autori au privit mecanismul de protecție unilateral, considerînd că substanțele radioprotectoare acționează simplu [9]. Cercetările noastre aduc un argument nou în favoarea admiterii unui proces complex, unde alături de fenomenele radiolitice cunoscute *in vitro* participă o serie de procese legate de intervenția sistemului nervos.

Modificări biochimice induse în țesuturi sub acțiunea substanțelor radioprotectoare. Cunoașterea mecanismului de acțiune al substanțelor radioprotectoare necesită studiul minuțios al unor procese biochimice legate de comportarea organismului mamiferelor iradiate sub protecție chimică.

Consumul de oxigen al țesuturilor

Se consideră în general că respirația și glicoliza sînt procese radiorezistente, care nu se modifică sub acțiunea dozelor terapeutice obișnuite de radiații decît în perioada de vîrf a bolii actinice acute, și în special în organele radiosensibile. Experiențele noastre au pus în evidență faptul că la șobolanii iradiați cu 500 R se produce o scădere evidentă a consumului de oxigen al splinei după 48 ore de la iradiere și o revenire la normal după 10 zile [10]. Administrarea de AET înainte de iradiere împiedică scăderea respirației, care rămîne la valori apropiate de cele normale. Se poate afirma că la animalul protejat cu AET acțiunea destructivă a radiațiilor X asupra proceselor energetice ale splinei este împiedicată, probabil datorită grupelor SH de la AET, care intră în competiție cu macromoleculele biologice pentru radicalii oxidanți formați în mediul iradiat, exercitînd astfel un fenomen de protecție.

Deoarece unul din mecanismele presupuse a explica acțiunea radioprotectoare a unor substanțe chimice este capacitatea de a produce hipoxia în țesuturi [10], noi am urmărit acțiunea unor substanțe chimice de sinteză (AET, aminotiazolină, cistamină) asupra consumului de oxigen al țesuturilor [11]. Așa cum reiese din tabela 2, administrarea acestor substanțe în doze care conferă protecție nu scade vizibil consumul de oxigen al splinei în intervalul studiat.

Lipsa de acțiune a AET-ului asupra respirației endogene se manifestă și asupra altor țesuturi, cum sînt timusul, ficatul, rinichiul [12]. Efectul protector al AET-ului nu pare să se datoreze inducerii unei hipoxii în țesuturi, ci probabil faptului că enzimele care conțin grupa SH nu mai sînt inactivate de radiații prin oxidare.

Interesant din acest punct de vedere se comportă o altă categorie de substanțe radioprotectoare, din clasa aminelor biologice, din care face parte și largactilul. Inoculat înainte de iradiere, largactilul conferă

Tabela 2

Consumul de oxigen al splinei după administrarea de radioprotectori chimici
(µl O_2/100 mg țesut umed/oră)

Normal	Iradiat	12 ore	24 ore	48 ore	4 zile	7 zile	10 zile
AET (300 mg/kg corp)							
69	71	83	87	74	76	78	73
Aminotiazolină (50 mg/kg corp)							
69	71	—	74	70	64	72	74
Cisteamină (150 mg/kg corp)							
69	—	70	—	70	80	78	—

organismului un oarecare grad de protecție. Urmărindu-se acțiunea lui asupra consumului de oxigen din țesuturi [13], [14], se constată o inhibiție puternică, care variază cu doza folosită și cu țesutul cercetat (ta-

Tabela 3

Acțiunea largactilului asupra consumului de oxigen al țesuturilor

Organul	mg substanță/100 mg țesut	µl O_2/100 mg țesut/oră	
		martor	probă
Creier	0,25	116	70
	0,5	103	56
	1	100	49
	2,5	92	13,7
Ficat	0,5	77	66
	1	82	64
	2,5	84	52
Rinichi	0,5	172	119
	1	185	92
	2,5	181	54

bela 3). Inhibiția este mai evidentă în creier; ficatul și rinichiul sînt influențați numai la doze mai mari de substanță.

Faptul că nu toate substanțele protectoare influențează consumul de oxigen al țesuturilor demonstrează că acest proces nu are un rol primordial în radioprotecție.

Conţinutul în acizi nucleici şi radioprotectorii

Acizii nucleici din organism sînt componenţii cei mai sensibili la acţiunea radiaţiilor ionizante, variaţiile lor cantitative putînd constitui un indiciu în privinţa gravităţii leziunii la nivelul ţesuturilor şi a modificărilor hematopoetice. După cum acţiunea radioprotectoare generală a unei substanţe poate fi pusă în evidenţă prin procentul de animale care supravieţuiesc după iradierea cu doze letale sau prin variaţiile numărului de leucocite, tot astfel, la nivelul ţesuturilor, existenţa unui efect de protecţie se poate măsura prin variaţiile cantităţii de acizi nucleici.

În lucrările noastre anterioare [15], [16] am constatat că, sub acţiunea dozei de 1000 R, în creierul, ficatul şi splina şobolanilor iradiaţi se produce o scădere a conţinutului de acizi nucleici în primele 2—5 zile de la iradiere, după care urmează fenomenul de restaurare a cantităţii iniţiale. Viteza de refacere a conţinutului în acizi nucleici depinde de natura ţesutului respectiv. Din aceste date a reieşit că gradul de protecţie al ţesuturilor iradiate sub influenţa AET + largactil şi testat prin variaţiile acizilor nucleici se manifesta cu intensităţi diferite: în creier, efectul protector apare după 24 de ore, în ficat el se manifestă după 2 zile şi în splină după 8 zile. Protecţia diferenţiată la nivelul ţesuturilor ne oferă indicaţii preţioase în legătură cu mecanismul general al radioprotecţiei medicamentoase. Reiese că procesul de protecţie evoluează în mai multe etape, manifestîndu-se la început la nivelul anumitor ţesuturi şi apoi prin influenţa reciprocă şi asupra altor ţesuturi.

Fenomenul general de protecţie începe cu refacerea mai rapidă a creierului şi apoi a ficatului, care la rîndul lor influenţează refacerea organelor radiosensibile. Prin urmare, trebuie să deosebim pe de o parte posibilitatea influenţării refacerii unui organ prin alt organ, mai bine protejat.

Rezultatele au altă semnificaţie la iradierea în prezenţa 2-propiltiazolidinei (2-PT) protector insolubil în apă, dar solubil în propilenglicol. Şi în acest caz se manifestă o protecţie diferenţiată, dar pentru alte ţesuturi decît la administrarea de AET + largactil: splina apare ca organul cel mai bine protejat, observîndu-se nu numai o refacere mai rapidă, dar şi evitarea netă a scăderii acizilor nucleici. În creier, ficat şi rinichi nu se observă diferenţe faţă de martorii iradiaţi, decît în ziua a 8-a.

Activitatea colinesterazei în radioprotecţie

Participarea intensă a sistemului nervos la instalarea şi evoluţia bolii actinice acute sau cronice a ridicat problema rolului unor enzime legate de funcţionarea sistemului nervos în declanşarea simptomelor specifice bolii. Plecînd de la faptul că unele dintre substanţele care inhibă sistemul nervos sînt anticolinesterazice recunoscute, prin cercetări anterioare [17] noi am pus în evidenţă faptul că o serie de substanţe folosite în radioprotecţie (cisteină, cisteamină, cistamină, AET.Cl.HCl, AET.Br.HBr, largactil, serotonină) au o importantă activitate anticolinesterazică (tabela 4). Acţiunea anticolinesterazică se manifestă cu predilecţie asupra colinesterazei serice, ducînd la presupunerea că pseudocolinesteraza este implicată în procesul de radioprotecţie. Colinesteraza din hematii este influenţată în mai mică măsură (tabela 5). Cercetări ulterioare, efectuate de noi, au pus în evidenţă faptul că colinesteraza din hematii poate fi

semnificativ influențată de prezența AET, *in vitro*, prin modificarea pH-ului sangvin. În condiții identice de modificare a pH-ului, colinesteraza serică prezintă aceeași valoare a inhibiției sub acțiunea AET, indiferent de valoarea pH-ului [18] (tabela 6).

Tabela 4

Acțiunea radioprotectorilor asupra colinesterazei serice

Substanța radioprotectoare	Inhibiție %
Glutation	nesemnificativ
Cisteină HCl	19
Cisteamină	67
Cisteamină 2HCl	39
AET.Cl.HCl	45
AET. Br. HBr	48
Largactil	92
Serotonină	53

Tabela 5

Acțiunea radioprotectorilor asupra colinesterazei din hematii

Substanța radioprotectoare	Inhibiție %
Glutation	0
Cistamină 2 HCl	8
AET. Br.HBr.	32
Serotonină	18

Tabela 6

Acțiunea AET.Cl.H.Cl. asupra colinesterazei la diferite pH-uri
(μl CO_2/30 min/0,2 ml hematii sau 0,1 ml ser)

pH	Hematii			Ser		
	fără AET	cu AET	inhibiție %	fără AET	cu AET	inhibiție %
7,4	118 (104—133)	83 (41—118)	30	173 (154—199)	95 (68—107)	45
8,4	116 (96—137)	70 (21—97)	40	153 (144—160)	89 (57—120)	42
6,4	94 (70—120)	23 (15—35)	76	157 (109—176)	78 (60—103)	44

Spre deosebire de substanțele protectoare din clasa cisteaminei și de aminele biologice, care au puternică activitate anticolinesterazică 2-PT exercită asupra colinesterazei serice o influență mult mai slabă *).

Un alt argument care sprijină ipoteza elaborată de O. Costăchel privind rolul sistemului nervos în radioprotecție se bazează pe faptul că administrarea unui anticolinesterazic recunoscut, metilfluorofosfonatul de

*) Lucrare nepublicată.

izopropil (MFI) la şoareci, înainte de iradiere cu doza de 900 R, conferă o protecţie de 50% faţă de martorii simplu iradiaţi, care mor toţi [19].

Acţiunea anticolinesterazică a AET a fost pusă în evidenţă de noi şi în ficatul animalelor iradiate sub protecţie cu această substanţă. Menţionăm că iradierea are influenţă mică asupra colinesterazei hepatice (cam 12%), în timp ce iradierea sub protecţie de AET produce o inhibiţie de 54%. În aceleaşi condiţii, în creier, care conţine numai colinesterază adevărată, nu se observă modificări asupra activităţii enzimei în raport cu lotul simplu iradiat [17] (tabela 7).

Tabela 7

Activitatea colinesterazei din creierul şi ficatul şobolanilor iradiaţi şi iradiaţi sub protecţie de AET Br.HBr

(după 48 de ore de la administrare)

Varianta	Inhibiţie %
Creier normal	0
Creier iradiat	16
Creier iradiat + AET	17
Ficat normal	0
Ficat iradiat	12
Ficat iradiat + AET	54

Aceste experienţe conturează ideea posibilităţii participării colinesterazei în mecanismul complex de radioprotecţie. Inhibiţia în mod special a activităţii pseudocolinesterazei în timpul acţiunii radiaţiilor creează posibilitatea atenuării efectului nociv. Procesul biochimic de inhibare sau activare a colinesterazei influenţează activitatea sistemului nervos, acţionînd astfel, prin intermediul lui, asupra întregului organism.

Acumularea peroxizilor lipidici în ţesuturile iradiate şi radioprotejate

Deoarece în radiobiologie se consideră că unul din mecanismele presupuse a interveni în acţiunea radiaţiilor asupra ţesuturilor ar fi formarea peroxizilor [20], cercetările noastre în curs urmăresc să stabilească legătura posibilă între radiosensibilitatea ţesuturilor şi viteza de apariţie a peroxizilor lipidici. Date preliminare au pus în evidenţă faptul că peroxizii lipidici se formează în splină după 24 ore de la iradiere, în ficat după 3 zile şi în creier după 4 zile de la iradiere, că valorile lor ating un maxim şi apoi încep să scadă. La iradierea şobolanilor cu doze de 1000 R, sub protecţie de largactil, se constată o cantitate mai mică de peroxizi, în această privinţă ficatul apărînd ca organul cel mai bine protejat [21].

Repartiţia AET în organism. Unul din factorii de care trebuie să ţinem seama în explicaţia gradului diferit de protecţie a ţesuturilor este repartiţia substanţelor radioprotectoare în organism. Modul de repartiţie al compuşilor protectori dă indicaţii preţioase în legătură cu mecanismul de radioprotecţie şi cu nivelul tisular la care acţionează substanţele radioprotectoare.

Cercetări efectuate în Institutul oncologic cu AET—^{35}S [22], [23], privind repartiția acestuia în țesuturi, au pus în evidență faptul că ficatul înglobează cea mai mare parte din substanță. În splină, cantitatea de AET marcat este mai mică, în timp ce mușchiul și rinichiul conțin cantități foarte mici de substanță, în raport cu ficatul.

Aceste date arată că numai repartiția substanței nu poate explica fenomenul de protecție de organ, deoarece în ficat, de exemplu, cantitatea de AET marcat este maximă și totuși gradul de protecție este mai mic decît în creier, unde protectorul se repartizează în mai mică cantitate.

CONCLUZII

I. Modificarea radiosensibilității în organism variază în funcție de natura țesutului respectiv. În același timp se constată că substanțele chimice radioprotectoare micșorează radiosensibilitatea unor țesuturi prin acțiunea lor directă, la care se adaugă răspunsul sistemului nervos, sub forma unei acțiuni indirecte.

II. Participarea sistemului nervos în realizarea actinoprotecției nu este exclusivă pentru substanțele care se adresează direct sistemului nervos (largactil), ci și pentru substanțele considerate că acționează printr-un mecanism radiolitic. În favoarea acestei ipoteze pledează cercetările efectuate în legătură cu acțiunea anticolinesterazică a substanțelor chimice radioprotectoare. La aceasta se adaugă faptul că protecția prin mecanism radiolitic în cazul polielectroliților macromoleculari sintetici nu depășește valoarea maximă de 70%.

III. Procesul de radioprotecție nu poate fi considerat că are loc sub forma unui mecanism unic (chimic, fizic sau biologic), deoarece cercetările efectuate dovedesc un proces în care participă fenomene complexe. Datorită acestui fapt, elaborarea unui mecanism de radioprotecție cît mai complet trebuie să aibă în vedere totalitatea fenomenelor ce pot avea loc în organismul iradiat și radioprotejat.

Prezentată la redacție la 26 ianuarie 1962

Institutul oncologic, București

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ РАДИОЗАЩИТЫ

РЕЗЮМЕ

В результате выполненных исследований авторы пришли к следующим выводам:

Изменение радиочувствительности организма зависит от природы соответствующей ткани. Вместе с тем констатируется, что радиозащитные химические вещества снижают радиочувствительность тканей

прямым воздействием, к которому добавляется реакция нервной системы в виде косвенного влияния.

Участие нервной системы в осуществлении актинозащиты не свойственно исключительно веществам, оказывающим прямое действие на нервную систему (ларгактил), а также веществам, которые действуют путем радиолитического механизма. В подтверждение последней гипотезы приводятся исследования, связанные с антихолинэстеразным действием радиозащитных химических веществ. Защита путем радиолитического механизма, для синтетических высокомолекулярных полиэлектролитов не превышает 70%.

Нельзя считать, что процесс радиозащиты имеет место в виде отдельного химического, физического или биологического механизма. Поэтому для выработки наиболее полного радиозащитного действия следует иметь ввиду совокупность явления, которые могут протекать в облученном и радиозащищенном организме.

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DU PROCESSUS DE RADIOPROTECTION

RÉSUMÉ

A la suite des recherches effectuées, on a abouti aux conclusions suivantes :

La modification de la radiosensibilité dans l'organisme varie en fonction de la nature du tissu respectif. On constate d'autre part que les substances chimiques radioprotectrices diminuent la radiosensibilité de certains tissus, par leur action directe, à laquelle s'ajoute la réponse du système nerveux, sous la forme d'une action indirecte.

La participation du système nerveux dans la réalisation de l'actinoprotection n'est pas exclusive pour les substances qui s'adressent directement au système nerveux (largactil), mais aussi pour les substances considérées comme agissant par un mécanisme radiolytique. Les recherches ayant trait à l'action anticholestérasique des substances chimiques radioprotectrices plaident en faveur de cette hypothèse. La protection au moyen du mécanisme radiolytique, dans le cas des polyélectrolytes macromoléculaires synthétiques ne dépasse pas la valeur maximum de 70%.

Le processus de radioprotection ne peut pas être considéré comme ayant lieu sous la forme d'un mécanisme unique (chimique, physique ou biologique). De ce fait, l'élaboration d'un mécanisme de radioprotection aussi complet que possible doit tenir compte de la totalité des phénomènes qui peuvent avoir lieu dans l'organisme irradié et radioprotégé.

BIBLIOGRAFIE

1. O. COSTĂCHEL, ST. GRIGORESCU, *Experimental and clinical data on the attempt to classify the radiobiological effect on higher organisms.* A II-a Conferinţă internaţională pentru folosirea energiei atomice în scopuri paşnice. Geneva 1958 (A conf. 15/p/1278 26—108).
2. Н. В. ЛУБНИК, Атомная энергия, **1**, *5*, 134 (1956).

3. С. Р. Зубкова, А. Л. Платонов, Докл. Акад. Наук СССР, **126**, *6*, 1354 (1959).
4. O. Costăchel, G. Furnică, O. Popovici, M. Furnică, Studii și cercetări de biochimie, Acad. R.P.R., **I**, *4*, 341 (1958).
5. O. Costăchel, G. Furnică, A. Drăgut, Studii și cercetări de chimie, Acad. R.P.R., **VII**, *3* (1959).
6. G. Furnică, *Tehnica nucleară*, I.D.T., București, *3*, 3 (1960).
7. O. Costăchel, St. Grigorescu și colaboratori, Bul. științific, Acad. R.P.R., secția șt. med., **VIII**, *3*, 867 (1956).
8. P. Alexander, Z. M. Bacq, *Principes de radiobiologie*, Paris, Masson, 1955.
9. O. Costăchel, M. Furnică, O. Popovici, G. Furnică, Studii și cercetări de biochimie **II**, *2*, 139 (1959).
10. A. Hollaender, G. E. Stapleton, Physiol., Rev., **33**, 77 (1953).
11. G. Furnică, M. Furnică, An. rom.-sov. seria chimie, *2*, 45 (1961).
12. G. R. Zins, A. B. Raymund, K. P. Du Bois, Toxicol. Appl. Pharmacol., **1**, 8 (1959).
13. O. Costăchel, M. Furnică, Studii și cercetări de chimie, **VI**, *1*, 59 (1958).
14. O. Costăchel, M. Furnică, Simpozionul de hipotermie și neuroplegie din 23—24 mai, 1958, București, 1961, 310.
15. O. Costăchel, M. Furnică, G. Furnică, O. Popovici, Studii și cercetări de biochimie, **III**, *1*, 21 (1960).
16. O. Costăchel, M. Furnică, O. Popovici, G. Furnică, *Rolul protecției prin AET asupra variațiilor acizilor nucleici în țesuturile iradiate*. Comunicată la Soc. șt. med., Cercul de oncologie, 26 mai 1959.
17. M. Furnică, G. Furnică, Studii și cercetări de biochimie, **IV**, *3*, 387 (1961).
18. M. Furnică, G. Furnică, *Participarea colinesterazei în mecanismul de radioprotecție*. Lucrare trimisă la Congresul de cancer, Moscova, 1962.
19. O. Costăchel, M. Furnică, G. Furnică, V. Dragon, *Date experimentale în legătură cu participarea colinesterazei în mecanismul de radioprotecție*. Comunicare la Soc. șt. med. secția oncologie, ședința din 25 aprilie 1961.
20. B. N. Tarusov, An. rom.-sov., seria med. gen., *3*, 36 (1958).
21. O. Costăchel, M. Furnică, V. Dragon, Studii și cercetări de biochimie, acest volum.
22. O. Costăchel, P. Tăutu, N. Voiculet, F. Chiraleu, *Contributions a l'étude de la distribution et fixation de l'AET—^{35}S dans l'organisme des rats normaux et irradiés*. Comunicare la Simpozionul de radiobiologie, Roma, 15—29 iunie 1960.
23. O. Costăchel, M. Furnică, N. Voiculet, *Données experimentales sur la protection d'organe par l'AET*. Comunicare la Simpozionul de radiobiologie, Roma, 15—29 iunie 1960.

HIDROLIZA TRIPTICĂ A PROTEINELOR ACVOSOLUBILE DIN CREIER

DE

DITA COTARIU

Cercetări electroforetice au dovedit că proteinele acvosolubile din creier prezintă un mare grad de heterogenitate. Astfel, M. Şerban [1] a arătat că proteinele creierului de bou, extrase cu o soluţie de NaCl 0,9% şi separate apoi prin electroforeză pe hîrtie, prezintă pe bandă un spectru format din 9—10 fracţiuni. Era foarte probabil ca aceste tipuri diferite de fracţiuni proteice să manifeste anumite proprietăţi care să permită diferenţierea lor şi după alte criterii decît cele de mobilitate electroforetică. Într-adevăr, cercetarea particularităţilor pe care le prezintă aceste proteine în procesul de salifiere şi desalifiere a arătat că, ţinînd seama de caracterul de solubilitate, denumirea de albumine, respectiv globuline acordată în mod arbitrar, prin analogie cu mobilităţile electroforetice ale fracţiunilor proteice din serul respectiv, nu corespunde întru totul [2].

Avînd în vedere interesul mereu crescînd pe care îl prezintă cercetarea naturii intime a proteinelor cerebrale, era interesant de a încerca stabilirea unor eventuale caracteristici de diferenţiere a lor şi după alte criterii decît cele amintite. De aceea, la propunerea acad. E. Macovschi, am luat în studiu problema comportării fracţiunilor proteice acvosolubile, separate prin electroforeză, în procesul de hidroliză enzimatică.

Folosirea enzimelor proteolitice în studiul substanţelor proteice cerebrale a fost practicată pînă în prezent în special în scopul separării anumitor componente proteice digerabile de altele nedigerabile [3], [4], al preparării de hidrolizate proteice cu anumite proprietăţi biologice [5] etc. Se semnalează de asemenea posibilitatea de a se hidroliza proteinele cortexului cerebral cu ajutorul unui factor proteolitic prezent în serul oamenilor sănătoşi [6].

Trebuie menţionat că nu am găsit în literatură cercetări similare asupra fracţiunilor proteice acvosolubile din creier în scopul ce ni l-am propus, nici în alte scopuri. Totuşi, trebuie relevat că recent au fost întreprinse studii asupra distribuţiei electroforetice a proteinelor din emisferele

cerebrale de iepure și a modificărilor suferite de acestea în timpul autolizei aseptice [7].

Ca material de cercetare s-au folosit extracte proteice din creier de bou, obținut la maximum două ore de la sacrificare. Probe medii de creier se spălau cu o soluție fiziologică de clorură de sodiu, apoi se uscau pe hîrtie de filtru și se curățau de meninge. Proba de creier se cîntărea, se tritura timp de 5 min cu nisip de cuarț și se lăsa în contact cu extractantul (soluție NaCl 0,9%) timp de 18 ore, la +4°C. Raportul de extracție era : o parte creier la 2,5 părți soluție de NaCl. Probele erau apoi centrifugate, întîi 20 min la 2000 rot/min, pentru îndepărtarea resturilor mai mari de celule, apoi la 11 500 rot/min.

Supernatantul limpede obținut, conținînd proteine în proporție de aproximativ 1%, a fost supus hidrolizei. Ca enzimă proteolitică s-a folosit tripsina cristalizată Merck. După încercări preliminare, s-a stabilit că concentrația optimă a enzimei este de 1%, iar raportul enzimă-substrat de 1/10. Fiind cunoscut faptul că pH-ul optim al enzimei variază și în funcție de natura substratului, s-au efectuat experiențe de hidroliză la diferite pH-uri, între 6,5—10, stabilindu-se ca pH optim 7,4—7,8. Menținerea pH-ului în cursul hidrolizei a fost asigurată prin adăugarea la extractul proteic a unei soluții tampon Britton-Robinson formată din : soluție de acid acetic 0,04 M, acid fosforic 0,04 M și acid boric 0,04 M, și NaOH 0,2 M. Enzima a fost dizolvată în aceeași soluție tampon. Experiențele s-au efectuat la termostat la 38°C.

Hidroliza triptică a proteinelor solubile cerebrale a fost urmărită cu ajutorul metodei Van Slyke modificată de Ț u v e r k a l o v (citat după [8]), determinările făcîndu-se imediat după adăugarea enzimei (punctul inițial) cît și după 1, 2, 3, 4, 5, 24, respectiv 48 ore. Rezultatele sînt exprimate în mg N/0,5 ml probă și reprezintă creșterea cantității de aminoacizi în probe în cursul hidrolizei. Pentru verificarea rezultatelor obținute s-au făcut, în paralel, determinări colorimetrice la fotometrul Pulfrich, prin metoda cu ninhidrină [9], creșterea cantității de aminoacizi din probe, ca rezultat al hidrolizei, fiind exprimată în acest caz prin creșterea valorii extincțiilor, precum și dozări polarografice, la care gradul de hidroliză a fost exprimat prin valoarea înălțimii undei catalitice proteice. În afara probelor în care s-a urmărit hidroliza, s-au făcut martori cu soluție de substrat fără enzimă sau cu enzimă inactivată prin fierbere precum și martori cu soluție de enzimă fără substrat.

După stabilirea condițiilor optime de hidroliză a proteinelor solubile cerebrale, s-a trecut la cercetarea acțiunii tripsinei asupra fracțiunilor proteice separate prin electroforeză pe hîrtie. Pentru obținerea hidrolizatelor s-a procedat ca mai sus. Soluțiile de analizat erau supuse electroforezei pe hîrtie după 1, 2, 3,5, 6, respectiv 24 ore de hidroliză. Ca martor s-a folosit un extract proteic total. Hidrolizatul era dializat față de apă distilată și tamponul folosit la electroforeză, apoi concentrat prin perevaporare. Deoarece prin adăugarea soluției tampon și a enzimei, extractul proteic supus hidrolizei era mai diluat decît martorul, pentru a avea o concentrație proteică egală se lua pentru perevaporare cantitatea corespunzătoare.

S-au utilizat benzi de hîrtie Whatman nr. 1, pe are se aplicau 20 µl de hidrolizat concentrat. Trebuie menționat că tripsina, în concentrația cu care s-a lucrat, nu dădea pe electroforegrame nici un spot vizibil. Analiza electroforetică s-a efectuat în soluție tampon veronal-veronal

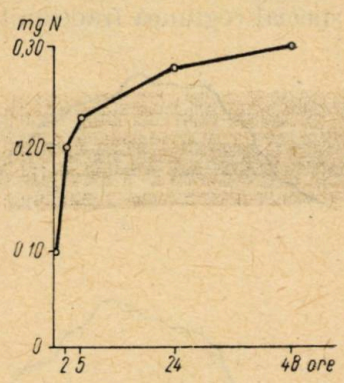


Fig. 1. — Variația cantității de aminoacizi (mg N) la diferite intervale de hidroliză.

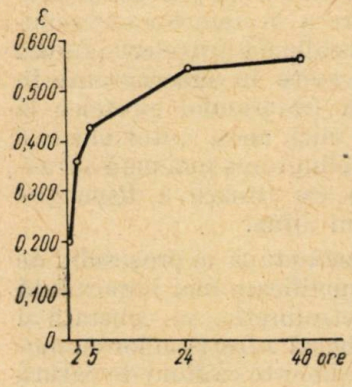


Fig. 2. — Variația cantității de aminoacizi (extincții) la diferite intervale de hidroliză.

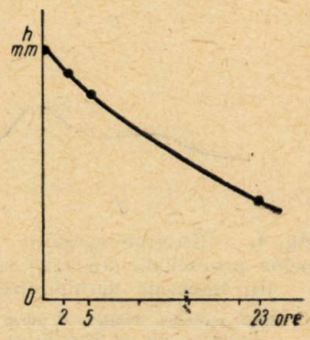


Fig. 3. — Variația înălțimii undei catalitice proteice (mm) la diferite intervale de hidroliză.

sodic de pH 8,6 și forță ionică 0,05 la tensiunea de 7 V/cm, intensitatea 0,3 mA/cm, timp de 8 ore. Colorarea benzilor se făcea cu albastru de bromfenol. Estimarea electroforegramelor s-a făcut cu integratorul MGF Berlin.

Analizînd rezultatele obținute, se constată că în primele 2—3 ore hidroliza se produce destul de rapid, încetinindu-se întrucîtva în intervalul 3—5 ore; ritmul ei devine foarte lent între 6 și 24 ore, pentru a fi neglijabil între 24—48 ore. Valorile determinărilor cantitative sînt redate în figurile 1—3.

S-a trecut apoi la examinarea electroforegramelor, și anume pentru acele etape de hidroliză în care, conform curbelor obținute, era de așteptat să se producă anumite modificări mai apreciabile (3, 5, 24 ore). Comparația s-a făcut cu electroforegramele extractului proteic total, în care se disting 9—10 fracțiuni proteice repartizate pe un fond difuz, ocupînd în special regiunea fracțiunilor cu mobilități medii (pe care le estompează în mare parte), considerat a fi constituit din complexe lipoproteice (fig. 4*a*) [2].

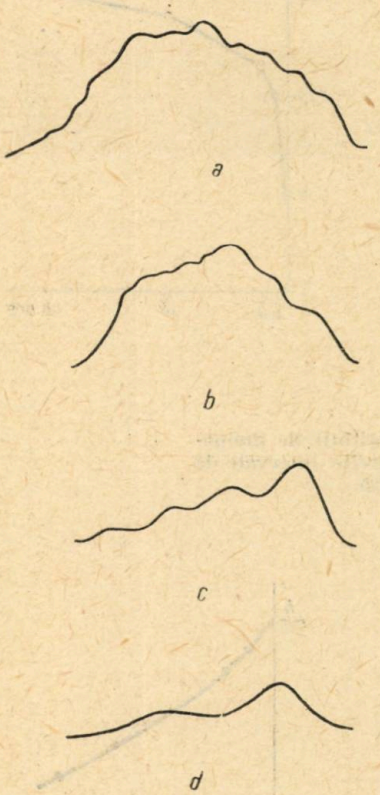


Fig. 4. — Electroforegramele proteinelor acvosolubile din creier la diferite intervale de hidroliză :

a) Martor (proteina totală); *b)* după 2 ore; *c)* după 5 ore; *d)* după 24 ore.

Examinînd electroforegramele hidrolizatelor din primele ore ale procesului de digestie, cînd acesta avansează rapid, se constată că enzima atacă în primul rînd fondul proteic difuz, astfel încît fracțiunile proteice devin mai clare și mai evidente. Acest fapt poate fi corelat cu constatarea făcută de M. Șerban [2] în cursul procesului de salifiere a proteinelor acvosolubile cerebrale : analizînd prin electroforeză modificările survenite în supernatante în urma precipitării fracțiunilor proteice la forțe ionice mai mici, acest autor observă evidențierea și delimitarea mai netă a fracțiunilor proteice ca urmare a dispariției tocmai a fondului difuz.

Tot în această etapă a procesului de hidroliză, ca o modificare mai importantă a spectrului electroforetic, se constată și dispariția de pe benzi a fracțiunilor cu mobilități mari, considerate ca fiind de natură albuminică, prin comparație cu mobilitățile proteinelor serice, și denumite „prealbumine". Dispariția completă a fracțiunilor proteice cu mobilități mari ar putea fi atribuită unei tendințe a enzimei de a hidroliza preferențial aceste fracțiuni, în sensul că ele ar fi mai puțin rezistente la atacul acesteia. În sprijinul acestui fapt se pot cita și cercetările electroforetice ale lui Ch. Wunderly [10] care, hidrolizînd proteinele serului sangvin cu pepsină, a constatat că enzima atacă în primul rînd fracțiunea albuminică în timp ce diferitele fracțiuni globulinice sînt degradate într-o măsură mult mai mică. G. Benassi și G. Berti [7] au constatat, la rîndul lor, că supunînd electroforezei autolizate de creier de 48 ore, pe lîngă alte modificări se produce și o scădere relativă a proteinelor cu migrare rapidă. S-ar putea însă și ca aceste fracțiuni prealbuminice să se găsească în extract în concentrație atît de mică, încît ele să dispară primele chiar

printr-o hidroliză nepreferențială, concentrația lor nemaifiind suficientă pentru a da spoturi vizibile pe benzile de electroforeză.

Pare foarte probabil că în această primă etapă enzima hidrolizează și din celelalte fracțiuni, astfel încît concentrația proteică totală din probe scade, deoarece electroforegramele apar mai puțin intens colorate decît cele martor în zonele corespunzătoare celorlalte fracțiuni deși concentrația proteică inițială a fost aceeași (fig. 4 *b*).

Examinînd electroforegramele hidrolizatelor proteice de creier după 5 ore de contact cu enzima, se constată transformări apreciabile în aspectul lor. În afara modificărilor semnalate, se observă o simplificare marcată a spectrului electroforetic; pe electroforegrame apar numai cinci fracțiuni foarte net delimitate și destul de bine exprimate, în special fracțiunea cu mobilitatea cea mai mică. Credem că această scădere a numărului de fracțiuni nu s-ar datora degradării totale a unora dintre ele, ci mai curînd unei aglomerări a fracțiunilor ca rezultat al modificării mobilităților lor electroforetice, în urma procesului de hidroliză (fig. 4 *c*).

Între 5 și 24 ore, deși hidroliza progresează foarte lent, se produce totuși degradarea majorității fracțiunilor proteice prezente în extract, așa încît, examinînd electroforegramele hidrolizatelor de 24 ore, constatăm estomparea aproape completă a fracțiunilor cu mobilități medii; ele apar pe benzi mai curînd sub forma unui fond slab colorat. În regiunea fracțiunilor cu mobilități mici, rămîne intens colorată o fracțiune mai greu digerabilă, foarte probabil rezultată din contopirea a două fracțiuni cu mobilități mici, modificate în urma hidrolizei și care nu s-au mai separat (fig. 4 *d*).

În concluzie, procesul de degradare enzimatică a proteinelor acvosolubile din creier nu se desfășoară, în timp, cu același ritm. Într-o primă fază hidroliza este rapidă și afectează în special fracțiunile proteice cu mobilități mari, precum și fondul difuz constituit din complexe lipoproteice; restul fracțiunilor proteice sînt și ele atacate, dar în mai mică măsură.

După 5 ore de hidroliză se constată modificări profunde ale spectrului electroforetic, în sensul simplificării acestuia ca urmare a modificării mobilităților fracțiunilor proteice degradate prin hidroliză.

Între 5 și 24 ore, hidroliza progresează într-un ritm foarte lent; în această fază sînt degradate fracțiunile cu mobilități medii, astfel încît după 24 de ore rămîn nedigerate 1—2 fracțiuni cu mobilități mici.

Rezultă deci că fracțiunile proteice acvosolubile din creier se comportă diferit în procesul de hidroliză enzimatică; aceasta reprezintă un aspect nou al deosebirilor existente între fracțiunile amintite și provenind din natura lor diferită.

Prezentată la redacție la 7 februarie 1962

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
București

ТРИПТИЧЕСКИЙ ГИДРОЛИЗ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ МОЗГА

РЕЗЮМЕ

Принимая во внимание значение выявления природы белков мозга, автор поставил себе целью исследовать поведение водорастворимых белковых фракций, извлеченных электрофоретическим путем, в процессе энзиматического гидролиза.

Исследования показали, гто процесс энзиматического разложения водорастворимых белков мозга не протекает во времени в одном и том же режиме. В начальной фазе гидролиз протекает быстро и в нем принимают участие преимущественно белковые фракции, обладающие большой подвижностью, а также недифференцированная фракция, состоящая из гликопротеиновых комплексов; остальные белковые фракции также гидролизуются, но в меньшей степени. После пяти часов гидролиза, констатируются глубокие изменения электрофоретического спектра, в смысле его упрощения, в результате изменения подвижности белковых фракций, деградированных в результате гидролиза. В промежутке времени от 5 до 24 часов гидролиз протекает в очень медленном темпе; в данной фазе разлагаются фракции, обладающие средней подвижностью, так что через 24 часа остаются непоглощенными 1—2 фракции с малой подвижностью.

Отсюда следует, что водорастворимые белковые фракции мозга ведут себя по-разному в процессе энзиматического гидролиза; это выявляет новое различие среди упомянутых фракций, зависящее от их различной природы.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Изменение количества аминокислот (Nмг) в различных фазах гидролиза.

Рис. 2. — Изменение количества аминокислот (экстинкция: E) в различных фазах гидролиза.

Рис. 3. — Изменение уровня белковой каталитической волны (мм) в различных фазах гидролиза.

Рис. 4. — Электрофореграммы водорастворимых белков мозга в различых фазах гидролиза: *a*) контроль (общее количество белка); *b*) через 2 часа; *c*) через 5 часов; *d*) через 24 часа.

HYDROLYSE TRYPTIQUE DES PROTÉINES HYDROSOLUBLES DU CERVEAU

RÉSUMÉ

Vu l'importance de la connaissance de la nature intime des protéines cérébrales, l'auteur s'est proposé d'étudier le comportement des fractions protéiques hydrosolubles, séparées par électrophorèse, dans le processus d'hydrolyse enzymatique.

Les recherches ont montré que le processus de dégradation enzymatique des protéines hydrosolubles du cerveau ne se déroule pas, au point de vue du temps, dans le même rythme. A la première phase l'hydrolyse est rapide et affecte en spécial les fractions protéiques à grandes mobilités, aussi bien que le fond diffus, constitué de complexes lipoprotéiques ; le reste des fractions protéiques sont elles aussi attaquées, mais dans une moindre mesure. Au bout de 5 heures d'hydrolyse, on constate des modifications profondes du spectre électrophorétique, dans le sens d'une simplification de celui-ci, comme suite de la modification des mobilités des fractions protéiques dégradées par l'hydrolyse. Entre 5 et 24 heures, l'hydrolyse progresse dans un rythme très lent ; dans cette phase sont dégradées les fractions à mobilités moyennes, de manière que, après 24 heures, restent non digérées 1—2 fractions à petites mobilités.

Par conséquent, il résulte que les fractions protéiques hydrosolubles du cerveau se comportent différemment dans le processus d'hydrolyse enzymatique ; ceci représente un aspect nouveau des différences existant entre les susdites fractions, provenant de leur nature différente.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Variation de la quantité d'acides aminés (mg N) *à* différents intervalles d'hydrolyse.

Fig. 2. — Variation de la quantité d'acides aminés (extinction) à différents intervalles d'hydrolyse.

Fig. 3. — Variation de la hauteur de l'onde catalytique protéique (mm) à différents intervalles d'hydrolyse.

Fig. 4. — Electrophorégrammes des protéines hydrosolubles du cerveau à différents intervalles d'hydrolyse : a) témoin (protéine totale) ; b) au bout de deux heures ; c) au bout de cinq heures ; d) au bout de 24 heures.

BIBLIOGRAFIE

1. M. ŞERBAN, Studii şi cercet. biochimie, *3*, 309 (1959).
2. M. ŞERBAN, Studii şi cercet. biochimie, *1*, 103 (1961).
3. R. J. BLOCK, J. Biol., Chem., **94**, 647 (1932).
4. Y. FOLCH, M. LEES, J. Biol., Chem., **191**, 807 (1951).
5. A. KOKTA, Zinatnisku Rakstu Krajums Rigas Med. inst., **5**, 63 (1956).
6. I. INONE, T. KANAI, Zyuzenkai Zassi (J. Perfect Health) **45**, 962 (1940).
7. G. BENASSI , G. BERTI, Sperimentale, **109**, 424 (1959).
8. А. Н. БЕЛОЗЕРСКИ, Н. И. ПРОСКУРЯКОВ, *Практическое руководство по биохимии растений*, Москва, 1951, 128.
9. S. MOORE, W. H. STEIN, J. Biol., Chem., **211**, 907 (1954).
10. CH. WUNDERLY, Nature, **158**, 556 (1946).

REȚINEREA ALBASTRULUI DE BROMFENOL DE CĂTRE FRACȚIUNILE PROTEICE SERICE ÎN PREZENȚA UNOR FIXATORI

DE

S. M. IDU, LUCIA COCIUMIAN și VL. GEORGESCU

În cazul colorării proteinelor, practicată în electroforeză, coeficientul de fixare $\left(\frac{\text{cantitatea de colorant}}{\text{cantitatea de proteine}}\right)$ variază atît cu natura colorantului cît și cu a fracțiunii proteice. Colorantul ideal ar trebui să aibă același coeficient pentru oricare din proteine, ceea ce pare că ar fi valabil în cazul negrului amido. Însușirile acestui colorant impun o tehnică laborioasă, motiv pentru care în practica curentă se lucrează mai mult cu albastru de bromfenol (ABF). Inconvenientul ce-l prezintă acest colorant ar putea fi eliminat prin raportarea valorilor obținute în determinare, la altele obținute cu substanțe etalon. În laboratorul clinic se stabilesc așa-numite „cifre normale", pe un lot de oameni sănătoși.

În soluția ABF se introduc totdeauna substanțe fixatoare pentru proteine ca : sublimat corosiv, sulfat de zinc, acid acetic, alcool etc. Aceste substanțe au și o acțiune asupra reținerii colorantului, deci ele ar modifica coeficientul de fixare, fapt observat și de noi cu ocazia schimbării modului de preparare a soluției de colorant.

În prezenta lucrare ne-am propus să studiem acțiunea cîtorva substanțe fixatoare introduse în 6 soluții de colorant experimentate de noi.

MATERIAL ȘI METODĂ

Din același ser și în aceeași zi s-au preparat 24 de benzi de electroforeză, din care cîte 4 au fost colorate cu aceeași soluție de colorant. Coeficientul de stabilitate a fost calculat

$$CS = \frac{x_{max} - x_{min}}{\bar{x}} \cdot 100$$

și a cărei valoare ideală ar fi 0.

Rolul substanțelor fixatoare s-a cercetat pe un lot de 50 de seruri. Din fiecare ser, în același aparat, s-au pregătit cîte 6 benzi colorate apoi

cu cei 6 coloranți experimentați după formulele indicate mai jos și numerotate în text și cifre romane.

I. Albastru de bromfenol 0,1 g, sublimat corosiv 5 g, alcool 100 ml (modificat după Machebœuf) [1].

II. Albastru de bromfenol 0,01 g, sulfat de zinc 5 g, acid acetic glacial 5 ml, apă distilată la 100 ml (după D u r r u m) citat după [2].

III. Albastru de bromfenol 1 g, alcool saturat cu sublimat 100 ml (după Durrum).

IV. Albastru de bromfenol 0,1 g, alcool 100 ml (după M. M. Mandelbaum) [3].

V. Albastru de bromfenol 0,1 g, acid acetic glacial 5 ml, alcool 95 ml (propus de noi).

VI. Albastru de bromfenol 0,1 g, alcool 40 ml, sulfat de zinc 5 g, acid acetic glacial 5 ml, apă distilată la 100 ml (propus de noi).

S-a folosit aparatul de electroforeză pe hîrtie realizat în atelierele IMF-București. Tampon veronal, pH 8,6; $\mu = 0{,}033$, timp de migrare = $= 3^1/_2$ ore. Colorarea s-a făcut în baie timp de 18 ore pentru colorantul II și 15 min pentru ceilalți. Spălarea benzilor s-a făcut cu soluție de acid acetic 0,5%. Evaluarea s-a făcut prin eluție [4].

Pentru prelucrarea statistică s-au folosit: N sau Σ_f = nr. determinări $\bar{x} = \frac{\Sigma_f}{\Sigma_f}$ = media aritmetică; $\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma_f (x - \bar{x})^2}{\Sigma_f}}$ = deviația standard; $m = \frac{\sigma}{\sqrt{\Sigma_f}}$ = eroarea medie a mediei: $CV = \frac{\sigma \cdot 100}{\bar{x}}$ = coeficient de variabilitate. Semnificația diferențelor dintre medii s-a calculat după formula $\frac{x}{\sigma} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$. Pentru $P < 0{,}05$ s-a considerat semnificativ cînd $\frac{x}{\sigma} > 2$.

În tabela 1 sînt date valorile coeficientului de stabilitate în determinare, pentru cele 5 fracțiuni proteice obținute prin determinări pe același ser.

Tabela 1

Variația coeficientului de stabilitate în funcție de fracțiunile proteice și colorant

	A	α_1	α_2	β	γ
I	6,00	5,10	23,80	6,20	4,20
II	4,10	26,60	13,40	5,70	5,60
III	1,40	9,70	6,90	13,90	5,80
IV	5,30	6,90	8,90	9,80	10,30
V	5,30	19,80	4,10	5,00	2,60
VI	7,50	14,60	15,90	15,80	10,80

Datele obținute pe cele 50 de seruri sînt prezentate în tabela 2. În tabela 3 se dau semnificațiile diferențelor între medii numai față

Tabela 2

Proteinograma pe 50 de cazuri — date comparative pe coloranți și fracțiuni
(metoda eluției)

Fracțiune și colorantul	*M*	σ	*m*	*v*
Albumine				
I	41,84	7,85	1,11	18,7
II	46,17	9,08	1,28	19,6
III	44,28	8,26	1,17	26,4
IV	40,00	7,28	1,02	18,2
V	40,50	6,55	0,92	16,1
VI	41,35	5,99	0,84	14,4
α_1-*Globuline*				
I	7,53	2,03	0,28	26,9
II	7,25	1,83	0,25	25,2
III	7,35	1,70	0,24	23,1
IV	7,98	1,71	0,24	21,4
V	7,78	1,35	0,19	17,3
VI	7,58	1,40	0,19	18,4
α_2-*Globuline*				
I	9,37	2,66	0,37	28,3
II	9,37	2,75	0,38	29,3
III	9,31	2,55	0,36	27,3
IV	10,52	2,67	0,37	25,3
V	10,31	2,45	0,34	23,7
VI	9,67	2,45	0,34	25,3
β-*Globuline*				
I	12,31	3,46	0,48	28,0
II	11,90	2,91	0,41	24,4
III	11,99	2,91	0,41	24,2
IV	11,54	2,88	0,40	21,2
V	13,39	3,40	0,33	17,9
VI	12,82	2,48	0,40	22,1
γ-*Globuline*				
I	28,94	5,25	0,74	18,1
II	25,27	5,83	0,82	23,2
III	27,39	6,49	0,91	23,6
IV	27,76	4,68	0,66	16,8
V	27,87	5,60	0,79	20,0
VI	28,52	5,00	0,70	17,5

Tabela 3

Semnificația diferențelor între medii
(N = 50)

Coloranți	A	α_1	α_2	β	γ
III — I	1,52	0,50	0,12	0,51	1,32
III — II	1,09	0,29	0,11	0,27	1,65
III — IV	2,77	1,86	2,30	2,71	2,39
III — V	2,50	1,41	2,04	2,69	0,40
III — VI	2,06	0,75	0,73	1,47	0,98

de colorantul III, care din calculele ulterioare s-a dovedit cel mai bun (CS mic pentru fracțiunile extreme A și γ și CV mare.)

DISCUȚIA REZULTATELOR

Albuminele prezintă o medie care variază pentru cei 6 coloranți între 40,00 (IV) și 46,17 (II).

Din punctul de vedere al comportării generale a celor 6 coloranți față de albumine se poate observa o grupare a coloranților II și III între care nu există diferențe sensibile, ambii înregistrînd valorile cele mai mari (46, 17 și 44, 28). A doua grupă formată din ceilalți coloranți (I, IV, V, VI) arată valori mai mici, cuprinse între 40,00 și 41,84.

α_1-*Globulinele* arată în general medii foarte apropiate, cuprinse între 7,25 pentru colorantul II și 7,98 pentru colorantul IV. Rezultatele pot fi considerate asemănătoare.

α_2-*Globulinele* arată medii între 9,41 pentru colorantul III și 10,52 pentru colorantul IV.

β-*Globulinele* arată medii cuprinse între 11,9 pentru colorantul II și 13,54 (IV).

γ-*Globulinele* arată medii între 25,07 (II) și 28,94 (I).

Fracțiunile electroforetice extreme (A și γ) separate mai pure, dau curbe gaussiene libere pe jumătățile exterioare, în parte și pe jumătatea suprafețelor interne a acestor fracțiuni. Faptul explică de ce s-a găsit CS mic în cazul albuminelor și γ -globulinelor. Fracțiunile interne din diagramă, prezintă interferențe pe ambele ramuri ale curbelor. Dispoziția curbelor pe diagramă explică variabilitatea mare a acestor 3 fracțiuni, cifra maximă fiind a α_2-globulinelor care ocupă poziția centrală și care este cea mai influențată de interferențele fracțiunilor vecine. Se poate stabili o succesiune în ordine descrescîndă a coeficientului de variabilitate și anume : A, γ, β, α_1, și α_2 care confirmă cele afirmate mai sus. Comparînd oscilațiile variației la cei 6 coloranți, reiese că în cazul colorantului VI se observă în general variabilitatea cea mai mică în opoziție cu coloranții II și III care au variabilitatea cea mai mare.

Variabilitatea mare pentru fracțiunile extreme (A și γ) în tehnica electroforezei poate fi atribuită unei sensibilități a colorantului pentru variațiile individuale ale subiecților din eșantion și aceasta cu atît mai mult în cazul coloranților unde pentru aceleași fracțiuni extreme coeficienții de stabilitate sînt foarte scăzuți, cum este cazul coloranților II, III și V. Pentru fracțiunile centrale este greu de presupus că indicațiile ce ni le dă coeficientul de variabilitate asupra sensibilității coloranților sînt concludente, dat fiind că observăm și o legătură între creșterea variabilității și creșterea instabilității în determinare.

Stabilitatea în determinare a fost apropiată prin CS din punctul de de vedere al fracțiunilor extreme este cel mai bun pentru coloranții II, III și V, iar din punctul de vedere al fracțiunilor centrale pentru coloranții III, IV și V. Din același motiv al interferențelor, stabilitatea fracțiunilor centrale este mult mai mică decît a fracțiunilor extreme care se izolează mai pure. Dacă se ia în considerare stabilitatea cea mai mare pe fracțiunile extreme cît și pe cele centrale, se alege între coloranții III și V. Conside-

rînd ca o calitate a colorantului o variabilitate mai mare pentru fracțiunile extreme, se preferă colorantul III. În funcție de cele trei criterii de apreciere, am stabilit ordinea următoare a calității coloranților, succesiune care trebuie să stea la baza alegerii în practică a formulei soluției de ABF (tabela 4).

Tabela 4

Criterii de apreciere și clasificare a coloranților

CS extreme		Variabilitate			CS central	
Colorant	$\frac{(A-\gamma)}{2}$	Colorant	A	γ	Colorant	$\frac{(\alpha_1+\alpha_2+\beta)}{3}$
III	3,60	III	26,4	23,6	IV	8,5
V	3,95	II	19,6	23,2	V	9,6
II	4,85	I	18,7	18,1	III	10,2
I	5,10	V	16,1	20,0	I	11,7
IV	7,90	IV	18,2	16,8	II	15,2
VI	9,15	VI	14,4	17,5	VI	15,4

Din cele de mai sus rezultă în același timp că cifrele normale folosite în interpretarea electroforegramelor trebuie stabilite experimental pentru fiecare colorant folosit. În cazul cînd s-au stabilit valorile normale cu un colorant, iar ulterior se schimbă modul de preparare a acestuia, vor trebui schimbate și valorile normale.

CONCLUZII

1. Substanțele adăugate în soluțiile de colorant folosite în electroforeză în scop de a fixa proteinele au și un efect evident asupra reținerii de coloranți, și pentru aceasta influențează rezultatele.

2. Coeficienții noștri de apreciere au arătat că este de preferat, soluția saturată de sublimat în alcool (III) și apoi soluția alcoolică de acid acetic glacial 5% (V).

3. În practica de laborator este absolut indispensabil să se folosească aceeași soluție de colorant cu care s-au stabilit valorile normale. In caz contrar se comit erori care se manifestă prin inversarea raportului între fracțiuni.

Prezentată la redacție la 24 ianuarie 1962

Clinica medicală IMF-Spitalul Colțea și Centrul de antropologie al Academiei R.P.R., București

BIBLIOGRAFIE

1. GIRARD M., DECHOSAL J., ROUSELET F., *Pratique d'électrophorèse sur papier en biologie clinique*, G. Doin et Cie, Paris, 1958.
2. IDU S. M., CÎMPEANU S., *Electroforeza*, Ed. medicală, București, 1957.
3. MANDELBAUM M. M., Bull. Soc. Chim., Biol., **36**, *2—3*, 203 (1954).
4. WUHRMANN F., WUNDERLY CH., *Die Bluteiweisskörper des Menschen*, Beno Schwabe, Basel, 1957.

I. PROBLEME GENERALE. METODE DE CERCETARE

1191. DIACONU P., *O metodă expeditivă pentru determinarea viabilității polenului de porumb.* Studii și cercet. biol., biol. veg., 1961, **XIII**, *4*, 529—537.

Viabilitatea polenului fiind strîns legată de participarea dehidrazelor la procesul de respirație, poate fi determinată folosindu-se o soluție 0,1% de clorură de 2, 3, 5-trifenil-tetrazoliu cu pH = 7,2 care prin reducere trece în formazan de culoare roșie.

H. Filipescu

1192. ISĂCESCU D. A., ȘTEFĂNESCU D. și URSU V., *Acțiunea oxidazică și peroxidazică. VII. Studiul complexului albastru obținut din catalază, hemină sau sulfat feros cu benzidină în prezența apei oxigenate prin infraroșii, izotopi radioactivi și microscopie electronică.* Studii și cercet. chim., 1960, **VIII**, *3*, 419—429.

Studiile făcute cu ajutorul spectroscopiei în infraroșu, a izotopilor radioactivi și al microscopiei electronice confirmă prezența fierului în precipitatele albastre obținute din reacția catalazei, heminei și sulfatului feros cu benzidina, în prezența apei oxigenate.

I. Tănase

1193. ARIEȘAN V., IONESCU C., ARIEȘAN M. și GAGIU F., *Determinarea colorimetrică a nitrofuranului în unele forme farmaceutice.* Farmacia, 1960, **VIII**, *5*, 397—400.

Se propune o metodă colorimetrică rapidă și comodă, folosind reacția de culoare a nitrofuranului în mediu de hidroxid de sodiu.

D. Moțet-Grigoraș

1194. BEDELEANU D., *Placenta (rol biochimic și aplicații terapeutice).* Farmacia, 1960, **VIII**, *8*, 545—555.

Referat general fără indicații bibliografice.

D. Moțet-Grigoraș

1195. SOLTZ A., *Activitatea punctului biochimic la Farmacia nr. 80 Pîncota.* Farmacia, 1960, **VIII,** *8*, 577—578.

Dare de seamă.

D. Moţet-Grigoraş

1196. MANTA I., *Aspecte din dinamica medicamentului în organism.* Farmacia, 1960, **VIII,** *9*, 609—617

Se trec în revistă cercetări recente care caută să explice acţiunea medicamentoasă prin modificarea activităţii sistemelor enzimatice celulare şi se jalonează unele direcţii de cercetare pentru viitor.

D. Moţet-Grigoraş

1197. MOLNAR I., TANKO P. şi WINTER J., *Prepararea şi controlul fiziologic al hormonului tireotrop.* Farmacia, 1960, **VIII,** *9*, 639—643.

S-a pus la punct metoda de preparare a tireotropinei romîneşti din turtele de presă rămase după extracţia celorlalţi hormoni hipofizari. Produsul este steril, netoxic, bine tolerat şi nu are substanţe depresoare sau vasopresoare peste limitele admise. Metoda este avantajoasă din punct de vedere economic şi poate fi aplicată la scară industrială.

D. Moţet-Grigoraş

1198. MANTA I. şi BEDELEANU D., *Asupra unui nou preparat de placentă, Plasefil.* Farmacia, 1961, **IX,** *1*, 25—30.

Se dă metoda de preparare. Se determină prezenţa globulinelor şi absenţa lipidelor şi lipoproteinelor. Azotul neproteic reprezintă 0,072 g%, cel proteic 0,040 g%, azotul aminoacizilor 7 mg%. Sînt prezenţi 12 aminoacizi. După testul biologic al efectului regenerativ al produsului asupra corneei incizate, produsul Plasefil este superior extractelor obişnuite placentare sau serului de bază.

D. Moţet-Grigoraş

1199. CĂPÎLNĂ S. şi CĂPÎLNĂ A., *Determinarea pH* in vivo *cu electrod de stibiu.* Fiziol. norm. pat., 1960, *2*, 117—122.

Autorii au construit un electrod de stibiu cu ajutorul căruia se pot face determinări de pH *in vivo*, în lichide biologice sau în ţesuturi. Electrodul este uşor de confecţionat şi dă rezultate reproductibile. Domeniul de aplicabilitate: de la pH = 0 la pH = 12.

E. Cristea

1200. PĂUNESCU E. şi GEORGESCU P., *Importanţa şi practica metodelor biochimice de determinare a concentraţiei sangvine în L.C.R. şi în urină a HIN şi a derivaţilor săi metabolici.* Ftiziol., 1961, **X**, *6*, 549—556.

Faţă de metodele bacteriologice, cele biochimice prezintă avantajul rapidităţii. Metodele biochimice pot fi simplificate în vederea introducerii în practică, fără ca scăderea sensibilităţii lor, ca urmare a acestor simplificări, să aibă vreo importanţă din punct de vedere practic.

D. Moţet-Grigoraş

1201. SEVERIN V. şi BURLACU M., *Contribuţii la selecţionarea tulpinilor de* Bacillus megaterium *var.* phosphaticus, *prin dozarea microbiologică a fosforului cu* Aspergillus niger. Lucr. şt. Centr. exp. de îngrăş. bact., 1960, **II**, 107—115.

În vederea întrebuinţării metodei biologice de dozare a P_2O_5 în extractele culturilor de *Bac. megaterium* pentru selecţionarea tulpinilor, autorii propun îmbogăţirea mediului de cultură pentru *Asp. niger* cu $MnSO_4 . 7H_2O$ — 0,005 % şi cu $CaCO_3$ — 0,5 %.

C. Săndulescu

202. LUPULESCU A., PETRESCU C., COCU FL., ŞERBAN AL. şi BABACA P., *Date recente asupra corelaţiilor tireoovariene.* Med. int., 1961, **XIII**, *9*, 1329—1341.

Referat general cu 51 indicaţii bibliografice, în care se prezintă cele mai noi cercetări experimentale şi clinice şi se aduc deducţii patogenice şi terapeutice.

C. Şelariu

1203. MARINESCU S. şi BĂLĂCEANU M., *Eritropoetina.* Med. int., 1961, **XIII**, *10*, 1351—1355.

Referat general fără indicaţii bibliografice.

C. Şelariu

1204. TEITEL P., *Probleme de patologie biochimică şi metabolică a leucocitului,* Med. int. 1961, **XIII**, *10*, 1355—1365.

Referat general fără indicaţii bibliografice.

C. Şelariu

1205. EPURE-FOTINO M., DANIELESCU M., BOIA M. şi CROHINOV A., *Identificarea anticorpilor incompleţi în sînge uscat. Nota I.* Med. int., 1961, **XIII**, *10*, 1457—1463.

Fragmentele de crustă sangvine se pun în contact între lamă şi lamelă cu o suspensie salină 0,2% de hematii papainate şi se observă la microscop apariţia aglutinatelor de hematii în jurul crustei, după o incubaţie de 15 min la 56°C.

C. Şelariu

1206. EPURE-FOTINO M., DANIELESCU M., BOIA M. şi CROHINOV A., *Identificarea anticorpilor incompleţi în sînge uscat. Nota II.* Med. int., 1961, **XIII**, *10*, 1463—1466.

Se descrie o metodă simplă de eluţie a anticorpilor incompleţi fixaţi pe hematii, prin punerea în contact între lamă şi lamelă a fragmentelor de cruste de sînge cu o serie de suspensii de hematii de grup O, cu mozaic antigenic diferit. Se controlează microscopic apariţia de aglutinate de hematii papainate, în jurul crustei, după o incubare de 20 min la 56°C.

C. Şelariu

1207. VAISLER L., COSTINER E. şi LUNGU AL., *Date noi în hormonologia tiroidei.* Med. int., 1961, **XIII**, *11*, 1587—1597.

Referat general cu 26 indicaţii bibliografice.

C. Şelariu

1208. MOŢOC F., *Consideraţii asupra chimiei fixării în cercetarea histochimică.* Morfol. norm. pat., 1961, *2*, 157—163.

Se arată importanţa procesului de fixare pentru cercetările histochimice şi necesitatea alegerii unui fixator adecvat atît specificului procedeului histochimic, cît şi elementului tisular studiat.

D. Cotariu

1209. LUPULESCU A., BABACA P. şi SĂHLEANU V., *Date recente în problema hormonilor ovarieni.* Obstetr. ginecol., 1960, **VII**, *6*, 481—495.

Referat general fără indicaţii bibliografice.

D. Moţet-Grigoraş

1210. ZOLOG N., *Utilizarea izotopilor radioactivi în diagnosticul tumorilor oculare.* Oftalmol., 1961, *2*, 93—100.

Referat general cu 11 indicaţii bibliografice.

D. Cotariu

1211. MÒDY J., *Metodă simplă pentru determinarea conţinutului în mucopolizaharide neutre al serului sangvin.* Rev. medic. Tg. Mureş, 1960, **VI**, *4*, 470—474.

Intensitatea reacţiei de culoare dintre PAS şi o picătură de ser uscat pe o hîrtie de filtru este proporţională cu cantitatea de mucopolizaharide neutre din ser. Prin eluare şi fotometrare se pot obţine indicaţii destul de precise asupra conţinutului serului în glucoproteine.

D. Moţet-Grigoraş

1212. CSONTOS A., *Titrarea sucului gastric cu soluţie de permanganat de potasiu.* Rev. medic. Tg. Mureş, 1960, **VI**, *4*, 474—477.

Reducerea permanganatului de potasiu este făcută de către substanţele proteice din sucul gastric. Acestea cresc în bolile de stomac şi pot fi titrate pe această cale. Prin metoda prezentată se pot aprecia procesele inflamatorii ale mucoasei gastrice, în special se poate afla dacă ele sînt active sau nu.

D. Moţet-Grigoraş

1213. MAŞKOVSKI M. D., *Substanţele medicamentoase folosite în anesteziologia modernă.* An. rom.-sov., med., 1961, *5*, 170—188.

Referat general cu 7 indicaţii bibliografice asupra substanţelor hipnotice, neuroplegice antihistaminice, colinolitice, analgezice, narcotice, anestezice locale, ganglioplegice, ca şi asupra unor preparate antagoniste.

D. Moţet-Grigoraş

II. BIOCHIMIA PROTIDELOR

1214. PORA E. A. şi RUŞDEA D., *Contribuţii la studiul modificării proteinelor serice în ontogenie şi în perioada de ouat la găini.* Com. Acad. R.P.R., 1960, **X**, *10*, 833—838.

În cursul ontogeniei puilor de găină se constată o creştere treptată a proteinelor serice; raportul A/G scade uşor o dată cu vîrsta şi creşte brusc la 7 luni. La cocoşi, valoarea proteinelor totale şi a fracţiunilor globulinice ale serului se menţin constante. La găinile ouătoare, proteinele serice cresc în fazele premergătoare formării albuşului şi revin la normal după expulzarea oului.

I. Tănase

1215. SPÎRCHEZ T., GHEORGHESCU B., BRASLĂ I., MERCULIEV EL. şi VASILESCU V. V., *Consideraţiuni asupra studiului metabolismului proteinelor în hepatita cronică cu ajutorul serum-albuminei umane iodate* (^{131}I). Studii şi cercet. med. int., 1961, **II**, *5*, 663—670.

S-au studiat 15 bolnavi cu diferite forme de hepatită cronică şi s-au constatat modificări variabile ale timpului de înjumătăţire (T 1/2) al proteinelor serice, determinat cu ajutorul serum-albuminei iodate. Aceasta denotă o stare catabolică exagerată, o depozitare hepatică sau tisulară crescută sau o eliminare digestivă accentuată. Se presupune că la baza hipoproteinemiei hepaticilor, alături de tulburările procesului de sinteză, de degradare şi de depozitare hepato-tisulară, intervine şi o eliminare digestivă crescută.

C. Iordache

III. BIOCHIMIA GLUCIDELOR

IV. BIOCHIMIA LIPIDELOR

V. ENZIME

1216. CĂPÎLNĂ S., *Obţinerea glutamico-decarboxilazei (GAD) şi determinarea manometrică a activităţii ei. I.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *3*, 531—536.

Se descrie extragerea din material vegetal (carote sau ardei), purificarea, precum şi proprietăţile glutamico-decarboxilazei. Se descrie de asemenea determinarea manometrică a activităţii acestei enzime.

H. D. Schell

1217. CĂPÎLNĂ S., *Stabilirea parametrilor de acţiune a GAD extrase din ardei (activitatea în funcţie de concentraţia enzimei, concentraţia substanţei, de timp, pH optim şi constanta Michaelis). II.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *3*, 537—542.

Pe lîngă stabilirea parametrilor de acţiune a GAD-ului amintiţi în titlul lucrării, autorul urmăreşte şi separarea prin electroforeză (la înaltă tensiune) a produşilor de acţiune ai acestei enzime.

H. D. Schell

1218. FADEI L., ILIESCU L. F. şi SPIRIDON M., *Aspecte ale dinamicii citocromoxidazelor în explantele de sarcom 2A, iradiate şi neiradiate.* Morfol. norm. pat., 1961, *2*, 165—171.

În culturile de tumoare martor există două categorii de elemente cu activitate citocromoxidazică diferită. Cantitatea citocromoxidazelor variază direct proporţional cu viteza de creştere a tumorii; la culturile iradiate dispariţia citocromoxidazelor coincide cu inhibiţia totală de creştere a tumorii. Determinarea activităţii enzimei în culturi tumorale ar putea constitui un test sensibil de apreciere a malignităţii acesteia.

D. Cotariu

1219. PETRESCU A., *Aspecte ale activităţii fosfatazei alcaline în tumori cerebrale (Notă preliminară).* Neurol. psih., 1961, **VI**, *3*, 215—223.

S-a constatat (cu metoda histochimică Gomori) că reacţia fosfatazei alcaline variază atît după natura tumorii cît şi regional, înăuntrul tumorii, şi s-a presupus o corelaţie între intensitatea de reacţie şi malignitatea tumorii. Cea mai intensă activitate fosfatazică este dată de nucleele celulare, iar cea mai slabă (la om şi carnivore) de neuronii atrofici hipercromi din vecinătatea tumorii.

N. Luţă-Moldoveanu

1220. GOLOVESKO S. M. şi LIBERZON M. D., *Importanţa diagnostică a determinării activităţii transaminazei în boala lui Botkin la copii.* An. rom.-sov., med., 1961, *5*, 84—90.

Determinarea transaminazelor serice este una din cele mai sigure metode de diagnostic precoce în acest caz. Creşterea importantă a activităţii acestor enzime (pînă la 2 000 UAT şi chiar peste) este caracteristică pentru ultimele zile din perioada prodromală şi începutul perioadei icterice. Scăderea bruscă a activităţii se înregistrează după 13—18 zile de la debutul bolii, în cazul evoluţiei obişnuite. La marea majoritate a bolnavilor de hepatită epidemică, activitatea TGP depăşeşte activitatea TGO, pe cînd în hepatita cronică este invers. Activitatea transaminazelor poate servi drept criteriu pentru diagnosticul diferenţial între boala lui Botkin şi icterele de altă etiologie.

D. Moţet-Grigoraş

VI. VITAMINE. HORMONI. ALŢI COMPUŞI BIOACTIVI

1221. MILCU ŞT. M., STĂNESCU V., FLOREA I. şi DINULESCU E., *Efectele timectomiei asupra unor modificări metabolice produse de administrarea acută de cortizon.* Com. Acad. R.P.R., 1960, **X**, *10*, 911—914.

Extirparea timusului la iepuri duce la scăderea în sînge a mucoproteinelor şi la creşterea proteinelor totale, a nucleoproteinelor şi a globulinelor α_2, β şi γ. Administrarea de cortizon la iepurii etimizaţi duce la scăderea în sînge a proteinelor totale, a globulinelor α_2 şi γ şi a nucleoproteinelor.

I. Tănase

1222. STĂNESCU V., FLOREA I. şi DINULESCU E., *Efectele timectomiei asupra modificărilor fosforului şi azotului urinar produse de administrare acută de cortizon.* Studii şi cercet. endocrinol., 1961, *1*, 41—44.

Absenţa timusului nu a influenţat în mod semnificativ nici valoarea absolută, nici creşterea relativă a eliminării de azot la iepuri trataţi timp de 3 zile cu doze de cortizon de 5 mg/zi. La animalele timectomizate, eliminarea urinară de fosfor este crescută apreciabil faţă de martorii intacţi, dar supuşi tratamentului cu cortizon.

D. Cotariu

1223. BĂLĂCEANU M., BIENER J., ALBU N. şi CHIVU V., *Studiul acţiunii unui hormon epifizar asupra dezvoltării embrionilor de găină.* Studii şi cercet. endocrinol., 1961, *1*, 59—63.

Aplicarea de hormon epifizar asupra membranei corioalantoidiene de embrion de găină a avut ca rezultat scăderea glicemiei şi a rezidiului sec şi impregnarea ficatului cu bilirubină. Nu s-au observat modificări în greutatea totală şi a organelor, nici în electroforeza proteinelor sangvine şi a glicogenului hepatic.

D. Cotariu

1224. DAMIAN E. şi IONESCU M., *Fracţionarea cromatografică a 17-cetosteroizilor urinari la iepure.* Studii şi cercet. endocrinol., 1961, *1*, 73—76.

Se arată compoziţia procentuală a fracţiunilor 17-cetosteroizilor urinari de iepure adult, comparativ cu cromatograme efectuate la om.

D. Cotariu

1225. MĂNESCU S., LUPULESCU A. şi RACOVEANU N., *Cercetări cu ajutorul radioiodului (^{131}I) asupra acţiunii guşogene a manganului din apă.* Studii şi cercet. endocrinol., 1961, *1*, 115—118.

În cantitate crescută, manganul ar exercita o acţiune guşogenă prin interferenţa sa în sinteza hormonilor iodaţi, şi anume oprind-o în fazele primare.

D. Cotariu

1226. ŞERBAN AL. M. D. şi STĂTESCU L., *Acţiunea gonadotrofinei corionice asupra încorporării ^{32}P la nivelul ovarelor, coarnelor uterine şi suprarenalelor la animalele hipotiroidizate experimental.* Studii şi cercet. endocrinol., 1961, *1*, 122—124.

Hipotiroidizarea experimentală şi administrarea de gonadotrofine corionice produc creşterea încorporării de ^{32}P la nivelul ovarelor şi coarnelor uterine. Administrarea de gonadotrofine corionice la animale hipotiroidizate influenţează negativ creşterea încorporării de ^{32}P.

D. Cotariu

1227. BENETATO GR., HAULICĂ I., RĂICIULESCU N., GRÜNSPAN M., COVĂSNEANU Z., GABRIELESCU E., STERESCU N. şi CÎRSTEA M., *Despre mecanismul de acţiune a histaminei în activarea hormonului adrenocorticotrop.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *3*, 377—390.

Se cercetează rolul histaminei în eliberarea hormonului adrenocorticotrop la 36 câini normali, cît şi la unii cu regiunea hipotalamică distrusă, folosind metoda de perfuzie a „capului izolat" şi a „creierului izolat". Rezultatele obţinute au arătat că dintre factorii umorali sau metabolici care exercită atît direct asupra hipofizei, cît şi asupra celulelor neurosecretoare rămase intacte o acţiune nespecifică de întreţinere a secreţiei adrenohipofizare, rolul cel mai important îl deţine histamina. Aceste date justifică presupunerea despre existenţa unui adevărat mecanism histaminergic în activarea hipotalamico-hipofizară a secreţiei adrenocorticotrope hipofizare.

H. D. Schell

1228. GROZA P., CORNEANU M. şi BUŞNEAG C., *Influenţa dezoxicorticosteronului asupra secreţiei gastrice.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *3*, 411—422.

Experienţele efectuate pe 5 câini (3 câini cu mic stomac Pavlov şi 2 câini cu fistulă Basov) au arătat că acetatul de dezoxicorticosteron (DOCA) inhibă secreţia stomacului atît în perioada administrării sale, cît şi după. Scăderea secreţiei este mai marcată după încetarea administrării de DOCA şi se menţine timp îndelungat. Se remarcă de asemenea o creştere a puterii digestive în timpul şi după tratament.

H. D. Schell

1229. LUPEA V., BODEANU V. şi BURGER H., *Cercetări în legătură cu conţinutul în vitamină B_1 al pîinii obţinute din făină de diferite extracţii.* Farmacia, 1960, **VIII**, *9*, 633—637.

Cea mai bogată în vitamină B_1 este pîinea neagră. Ţinînd seama şi de coeficientul de asimilare a pîinii, pîinea semialbă, obţinută din făină de extracţie 70%, este cea care poate servi mai bine la hrana omului. Nevoile organismului în vitamină B_1 neputînd fi însă acoperite exclusiv de pîinea ingerată în 24 de ore, autorii recomandă îmbogăţirea cu vitamină B_1 a acestui produs.

D. Moţet-Grigoraş

1230. ŞTEFAN V., BALINSCHI I. şi BOTI D., *Acţiunea filtratului de* Gibberella Fujikuroi saw *asupra plantelor de cînepă şi porumb.* Lucr. şt. Centr. exp. de îngrăş. bact., 1960, **II**, 249—259.

S-a determinat conţinutul în fosfor şi azot la plante de cînepă şi porumb tratate cu filtrat de *Gibberella* şi s-a constat că efectul stimulator asupra plantelor a fost mai puternic în cazul cînd acest tratament a fost asociat şi cu o nutriţie corespunzătoare.

C. Săndulescu

1231. MOZES M. şi BUSTYA I., *Rolul suprarenalelor în evidenţierea efectului metabolic al hormonului tiroidei.* Rev. medic. Tg. Mureş, 1960, **VI**, *3*, 349—352.

Cortizonul nu influenţează metabolismul gazos al şobolanilor normali, dar modifică pe cel al animalelor tiroidectomizate, suprarenalectomizate sau suprarenalectomizate şi tiroidectomizate. Acţiunea directă a hormonului se manifestă prin diminuarea consumului de oxigen, efectul indirect fiind mediat de tiroidă. Acţiunea metabolică a hormonului tiroidei apare numai în prezenţa suprarenalelor sau a cortizonului, iar la animalele suprarenalectomizate şi tiroidectomizate, numai în urma administrării de vitamină C.

D. Moţet-Grigoraş

1232. ПОРА Е. А., ШВАРЦ А., МАДАР И., ГИРКОЯШУ, М., КИШ З., ФАЛЬЗЕГУ Е., АБРАХАМ С. КОВАЧ В., *Действие инсулина и витамина* B_2 *на обменные процессы изолированной диафрагмы крысы.* Revue biol., 1961, **VI**, *2*, 157—168.

Insulina are acţiune importantă asupra încorporării glucozei în diafragma de şobolan. Prezenţa riboflavinei măreşte de 10 ori acest efect. În ceea ce priveşte cantitatea de glicogen, acţiunea acestor substanţe e antagonistă, în sensul că riboflavina accelerează atît scindarea acesteia cît şi a glucozei rezultate. S-au cercetat şi aminoacizii ce apar în urma acţiunii acestor substanţe, atît în diafragmă cît şi în omogenate, în legătură cu proteoliza.

D. Moţet-Grigoraş

VII. BIOCHIMIA MICROBILOR. VIRUSURI. BACTERIOFAGI. ANTIBIOTICE. IMUNOCHIMIE

1233. PETRESCU D., SCHIAU S., BOROŞ I., SUHACIU GH., GHIZARI E., DUMITRESCU-PAPAHAGI E. şi STOENESCU R., *Formarea anticorpilor imuni la iepurii iradiaţi şi suprarenalectomizaţi.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *3*, 447—454.

Se studiază producerea de anticorpi după o injecţie intravenoasă de bacili omoriţi (Pratens $X_{19}O$), la un lot de iepuri iradiaţi şi suprarenalectomizaţi, în raport cu o serie de loturi martore: iepuri iradiaţi şi cu suprarenala intactă, iepuri neiradiaţi şi suprarenalectomizaţi, iepuri normali şi neiradiaţi. Inhibarea formării de anticorpi prin iradiere este mai accentuată la animalele suprarenalectomizate.

H. D. Schell

1234. SIMITI I. şi IVANOF A., *Contribuţii la studiul unor enzime microbiene. I. Prezenţa arginazei, arginindihidrolazei şi a ureazei la cîteva specii microbiene; micrometode de punere în evidenţă a acestor enzime.* Studii şi cercet. Cluj, med., 1960, *2*, 281—285.

Se descriu micrometode rapide pentru punerea în evidenţă a arginazei, arginindihidrolazei şi ureazei la microorganisme. *Pseudomonas aeruginosa* şi stafilococul patogen au activitate arginazică şi arginindihidrolazică intensă; *B. antracis* are activitate arginazică mare; salmonelele

și klebsielele au pentru cele două enzime activitate redusă. *Shigella Sonnei* și *E. coli* de tip fecal nu au activitate arginazică și arginindihidrolazică. La speciile studiate nu există corelație între activitatea ureazică și cea arginindihidrolazică și arginazică.

C. Gurban

1235. IVANOF A., SIMITI I. și IVANOF L., *Contribuții la studiul unor enzime bacteriene. II. Studiul factorilor care influențează activitatea arginazei, arginindihidrolazei și ureazei; mecanismul de schimbare a grupării guanidinice în arginină.* Studii și cercet. Cluj, med., 1960, *2*, 287—293.

Studiul factorilor care influențează actvitatea enzimelor menționate arată că arginaza are pH-ul optim 8 și temperatura optimă 56°C. Arginindihidrolaza are pH-ul optim 5,6 și temperatura optimă 30—37°C. Activitatea acestor enzime nu este influențată de prezența streptomicinei. Se trage concluzia că arginina este schimbată de un complex enzimatic, în care pe lîngă arginază și arginindihidrolază e posibilă și intervenția citrulinazei.

C. Gurban

1236. VÎNTU O., *Dinamica fixării azotului molecular și a consumului de glucoză în culturile de* Azotobacter chroococcum. Lucr. șt. Centr., exp. de îngrăș. bact., 1960, **II**, 75—77.

În culturi lichide de *Azotobacter* s-a găsit că — timp de 9 zile de la data însămînțării — acestea fixează 14,5 mg azot la 1 g glucoză consumată, iar cantitatea de azot fixată zilnic este proporțională cu cantitatea de glucoză consumată. După 9 zile fixarea azotului încetează.

C. Săndulescu

1237. BUCUR E. și LAZĂR I., *Cromatografia aminoacizilor unor bacterii fitopatogene.* Lucr. șt. Centr. exp. de îngrăș. bact., 1960, **II**, 243—247.

Cu ajutorul cromatografiei pe hîrtie, s-a constatat că treonina, alanina și prolina sînt prezente în toate bacteriile studiate; în ceea ce privește însă ceilalți aminoacizi, există diferențe la bacterii de genuri diferite. Totodată, mediul cu extract de porumb este recomandat ca fiind cel mai prielnic pentru sintetizarea mai multor aminoacizi de către bacterii.

C. Săndulescu

1238. OPREANU I. și BONCIU O., *Considerații generale asupra acțiunii bacteriostatice și bactericide a unor izvoare de apă minerală din țara noastră.* Med. int., 1961, **XIII**, 7, 1079—1086.

Autorii determină acțiunile bacteriostatice și bactericide la o serie întreagă de izvoare de apă minerală din țară, găsind acțiuni pozitive la majoritatea lor. Această acțiune nu se păstrează prin conservarea apei. Acțiunile se explică prin proprietățile chimice și fizice complexe ale apelor minerale (mai ales prezența radiului și radonului).

C. Șelariu

VIII. BIOCHIMIE VEGETALĂ

1239. SĂNDOIU D., SLUŞANSCHI H., RAIU I. şi MILIŢESCU L., *Influenţa secetei experimentale din sol, în diferite faze de vegetaţie, asupra producţiei şi acumulării componentelor chimice la orz.* Studii şi cercet. biol., biol. veg., 1961, **XIII**, *4*, 448—466.

Seceta a stînjenit acumularea componentelor chimice în acele părţi ale plantei care se găsesc în curs de creştere. Boabele rezultate de la plantele expuse secetei sînt totdeauna mai bogate în proteină brută şi în fosfor şi mai sărace în substanţe extractive neazotate.

H. Filipescu

1240. ZAMFIRESCU N. şi URTILĂ ŞT., *Influenţa luminii asupra absorbţiei fosforului la porumb şi soia, determinată cu ajutorul izotopului* ^{32}P. Studii şi cercet. biol., biol. veg., 1961, **XIII**, *4*, 507—517.

Sub influenţa luminii, intensitatea de absorbţie a fosforului a crescut cu 281 % la porumb şi cu 89 % la soia.

H. Filipescu

1241. SĂLĂGEANU N. şi ATANASIU L., *Despre fotosinteza la frunzele persistente ale unor specii în decursul iernii.* Studii şi cercet. biol., biol. veg., 1961, **XIII**, *4*, 517—527.

Frunzele de *Hedera helix* asimilează CO_2 încă la —6°C, cele de *Thuya orientalis* la —9°C, cele de *Mahonia aquifolium* la —6,5°C iar cele de *Buxus sempervirens* pînă la —5°C.

H. Filipescu

1242. PORSCHE TH., *Utilizarea acidului uric de către* Saccharomyces cerevisiae *ca unică sursă de azot.* Studii şi cercet. Timişoara, chim., 1961, **VIII**, *1—2*, 181—183.

Saccharomyces cerevisiae se poate înmulţi utilizînd acid uric ca unică sursă de azot, după ce s-au produs modificări adaptative ale aparaturii enzimatice. Pe această cale s-ar putea încerca obţinerea preparativă a unei uricaze din acest microorganism.

N. Luţă-Moldoveanu

1243. TARPO E. şi CUCU V., *Despre valoarea cojii de frangula indigenă.* Farmacia, 1960, VIII, *5*, 371—376.

Prin dozări fotocolorimetrice s-a găsit un conţinut de oximetilantrachinone totale care variază între 1,50 şi 3,52 %. Conţinutul în oximetilantrachinone libere variază între 0,00 şi 3,98 % din totalul de oximetilantrachinone.

D. Moţet-Grigoraş

1244. CALCANDI V., CIROPOL-CALCANDI J. şi CONSTANTINESCU C., *Studii asupa fructelor şi uleiului de* Coriandrum sativum L. *din R.P.R.* Farmacia, 1960, VIII, *5*, 383—390.

S-a determinat mărimea fructelor, cenuşa totală, cenuşa insolubilă în HCl 10 %, uleiul volatil, uleiul gras şi substanţele azotate din fructele provenite din diferite regiuni de cultură, precum şi solubilitatea, indicele de aciditate, indicele de saponificare, indicele de esterificare şi alcoolii totali din uleiul de coriandrum indigen.

D. Moţet-Grigoraş

1245. CALCANDI V., CIROPOL-CALCANDI J. şi GEORGESCU E., *Contribuţii la studiul fructelor şi uleiului de* Carum Carvi L. *cultivat în R.P.R.* Farmacia, 1960, VIII, *6*, 429—434.

S-a determinat mărimea fructelor, cenuşa totală şi cea insolubilă în HCl 10 %, uleiul volatil, uleiul gras şi substanţele azotate din fructe. La ulei s-a determinat solubilitatea şi conţinutul în carvonă.

D. Moţet-Grigoraş

1246. GRIGORESCU E., ISTRATE M. şi STĂNCULESCU A., *Contribuţii la studiul farmacognostic al produsului* Rhizoma Gei. Farmacia, 1960, VIII, *6*, 441—446.

S-a făcut un studiu dinamic al conţinutului taninurilor în rizom şi rădăcinile de cerenţel, în funcţie de perioada de vegetaţie şi localizarea geografică. Din taninul brut s-au izolat acidul galic, acidul elagic şi o fracţiune neidentificată.

D. Moţet-Grigoraş

1247. IURACEC AL., IOACHIMESCU E. şi ZAMFIRESCU I., *Contribuţii la studiul muşeţelului din Republica Populară Romînă. III. Conţinutul în chamazulen al muşeţelului spontan colectat în 1957 şi 1958.* Farmacia, 1960, VIII, *8*, 579—587.

În uleiul volatil s-a găsit un conţinut de chamazulen cuprins între 3,09 şi 10,34 mg % în 1957 şi 2,80—14,22 mg % în 1958. În drogă cantitatea a fost între 14,5—67,90 mg % în 1957 şi

între 14,47—102,61 mg% în 1958. Mușețelul recoltat în vestul țării și în Transilvania, în special în regiunea Hunedoara, conține cea mai mare cantitate. Mușețelul romînesc conține cantități mai mari decît cel cehoslovac.

D. Moțet-Grigoraș

1248. GRIGORESCU E., *Conținutul în acid ascorbic al fructelor de cătină* (Hippophae rhamnoides L.) *din R.P.R.* Farmacia, 1961, **IX**, *1*, 31—38.

Concentrația variază în funcție de perioada de vegetație și de altitudine. Concentrația maximă a fost găsită în lunile august și septembrie în regiunea Cheia, la o altitudine de 800 m (323 mg%).

D Moțet-Grigoraș

1249. GHEORGHIU A., CONSTANTINESCU A. și IONESCU-MATIU E., *Contribuții la separarea și identificarea alcaloizilor din planta* Scipolia Carniolica Jacq. Rev medic. Tg. Mureș, 1960, **VI**, *3*, 347—349.

S-au pus în evidență cu ajutorul electroforezei pe hîrtie, trei fracțiuni. Primele două corespund scopolaminei și hiosciaminei, pe cînd cea de a treia nu este menționată în literatură În lumină ultravioletă, electroforegramele obținute cu extract au indicat prezența a cinci spoturi fluorescente, dintre care unul caracteristic atribuit metilesculentinei. În cazul „alcaloizilor totali" s-au pus în evidență 3 spoturi fluorescente.

D. Moțet-Grigoraș

1250. FÜZI J., PÉTER M. și KISGYŐRGY Z., *Contribuții la cunoașterea efectului antibiotic al urzicii* (Urtica Dioica L.). *II.* Rev. medic. Tg. Mureș, 1960, **VI**, *4*, 467—470.

Părțile aeriene ale urzicii păstrează în tot timpul vegetației, și în special în lunile mai și iunie, un efect inhibitor asupra dezvoltării următorilor patogeni cercetați : *Shigella paradysenteriae, Sh. ambigua, Sh. sonnei, Pasteurella aviseptica* și în special asupra stafilococului aureu hemolitic, rezistent la antibioticele întrebuințate curent.

D. Moțet-Grigoraș

1251. ЗАМФИРЕСКУ Н, БЫЛТЯНУ Т. и ИРТИЛЭ С., *Влияние температуры на поглощение фосфора кукурузой, фасолью и горохом, определенное при помощи радиоактивного фосфора* ^{32}P Revue biol., 1961, **VI**, *1*, 33—42.

Izotopii radioactivi cuprinși în cantități mici în soluții nutritive complexe au permis urmărirea acțiunii temperaturii asupra absorbției acestor soluții. Cu ajutorul ^{32}P s-au determinat temperaturile optime de absorbție la porumb, fasole și mazăre.

D. Moțet-Grigoraș

1252. ГЕЦИЕ В., *Электрофоретические исследования некоторых тканевых белков растительного происхождения*. Revue de chimie, 1960, **V**, 1, 139—150.

Prin electroforeză şi desalifierea fracţiunilor globulinice ale proteinelor din seminţele de fasole, s-au separat componentele α, β şi γ care, după cum rezultă din comportarea polarografică şi analiza cromatografică, există ca individualităţi chimice bine definite în sămînţă. În procesul germinativ, fracţiunea globulinică suferă o hidroliză enzimatică intensă, o parte din aminoacizii rezultaţi servind la formarea proteinelor tisulare ale plantelor, pe cînd fracţiunea albuminică nu se hidrolizează decît relativ puţin. Proteinele ţesutului foliar diferă între ele, după cum provin din citoplasma sau vacuolele celulelor.

N. Luţă-Moldoveanu

1253. RABEGA C., OŞORHAN T., STĂNESCU R. şi RABEGA M., *Influenţa microelementelor molibden, mangan, bor şi cobalt asupra încolţirii seminţelor şi evoluţiei cîtorva componente biochimice din plantulele de floarea-soarelui (Nota I)*. An. Univ. „C. I. Parhon", şt. nat., 1960 *24*, 45—50.

Soluţiile de $(NH_4)_2MoO_4$ $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, H_3BO_3 şi $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ în concentraţii de $3^0/_{00}$ au mărit procentul seminţelor încolţite în interval de 10 zile. Dintre aceste microelemente, numai Mo şi B determină creşterea azotului total şi a celui proteic. Substanţele reducătoare au crescut în urma tratamentului cu Mn, B şi în special cu Co.

D. Moţet-Grigoraş

1254. RABEGA C., OŞORHAN T., RABEGA M. şi STĂNESCU R., *Influenţa microelementelor cupru, nichel, zinc şi fier asupra încolţirii seminţelor şi evoluţiei cîtorva componente biochimice din plantulele de floarea-soarelui (Nota II)*. An. Univ. „C. I. Parhon", şt. nat., 1960, *24*, 51—54.

Soluţiile de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $Ni(CH_3 \cdot COO)_2 \cdot 4H_2O$, $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ şi $K_3(Fe(CN)_6)$ în concentraţie de $3^0/_{00}$ au avut o acţiune favorabilă asupra încolţirii. Dintre aceste microelemente, numai cuprul şi nichelul determină creşterea azotului total şi proteic. Substanţele reducătoare cresc în urma acţiunii zincului şi a cuprului.

D. Moţet-Grigoraş

1255. NESTORESCU E. şi ELIADE GH., *Influenţa raportului C/N din sol asupra randamentului procesului de amonificare*. An. Univ. „C. I. Parhon", şt. nat., 1960, *24*, 55—60.

În cursul procesului de amonificare a peptonei, cantitatea de azot mineral scade cînd în sol raportul C/N creşte. Aceasta s-ar datora unei mai intense reutilizări a azotului mineral format de către microorganisme.

D. Moţet-Grigoraş

IX. BIOCHIMIE ANIMALĂ

1256. PORA E. A., ROŞCA D. I., WITTENBERGER C., STOICOVICI F. şi RUŞDEA D., *Cercetări asupra echilibrului cationilor din sîngele de cîine.* Com. Acad. R.P.R., 1960, **X**, *10*, 839—846.

Se urmăresc modificările cantitative ale cationilor (Na, K şi Ca) în sîngele de cîine la 5 min după dublarea concentraţiei lor în urma injectării bruşte a unei soluţii de NaCl, KCl sau $CaCl_2$. Dublarea cantităţii unui cation produce o serie de modificări compensatorii de diferite valori care în totalitatea lor pot dura pînă la 6 ore după injectare.

I. Tănase

1257. FESZT T., ALMASI S. şi FESZT GH., *Rolul sistemului nervos central în acţiunea hidrazidei acidului izonicotinic exercitată asupra ţesutului tiroidian.* Com. Acad. R.P.R., 1960, X, *10*, 915—920.

Administrarea de HIN singură sau asociată cu diiodotirozina la şobolani masculi, produce o creştere în greutate a glandei tiroide. Efectul excitant al HIN asupra sistemului nervos e inhibat de medinal ceea ce duce la o scădere a greutăţii glandei tiroide.

I. Tănase

1258. PORA E. A. şi WITTENBERGER C., *Fixarea* 32p *în muşchii crapului în repaus şi în activitate.* Com. Acad. R.P.R.. 1960, **X**, *11*, 1001—1007.

După administrarea intraabdominală de $NaH_2{}^{32}PO_4$ la crap, se remarcă o înglobare a ^{32}P în muşchii aductori ai înotătoarei pectorale şi în muşchiul lateral profund (alb) care atinge un maximum la 1—3 ore de la injectare. În repaus, nivelul fixării de ^{32}P diferă în funcţie de muşchi. După excitarea muşchilor aductori, înglobarea de ^{32}P atinge o valoare dublă faţă de martor.

I. Tănase

1259. POPOVICI D. GH., *Date experimentale asupra inhibiţiei evacuării laptelui şi rolul adrenalinei în reglarea activităţii motorii a glandei mamare.* Com. Acad. R.P.R., 1961, **XI**, *1*, 65—72.

Adrenalina administrată intramuscular în doze de 0,010—0,0319 mg/kg, exercită asupra celulelor mioepiteliale din parenchimul glandular o acţiune în urma căreia are loc o evacuare a laptelui.

I. Tănase

1260. PORA E., *Rolul sistemului nervos în repartiția ^{32}P O_4H_2Na în organele viscerale și în utilizarea acestei substanțe de către mușchi.* Studii și cercet. biol., biol. anim., 1961, **XIII**, *1*, 13—28.

După 24 de ore de la secționarea vagului la șobolan și după spinalizarea broaștelor, are loc o utilizare anormală a fosfaților de către organele interne. La administrarea de fosfat prin electroliză (tip Leduc), toată substanța pătrunsă în animalul de la polul pozitiv (prin tegumentul piciorului posterior) se acumulează în ficat. Gastrocnemianul obosit fixează mai mult ^{32}P decît cel în repaus. Gastrocnemianul obosit sau cu sciaticul secționat menținut *in situ* în soluții de fosfat marcat, fixează mai puțin ^{32}P decît mușchiul în repaus sau cu sciaticul intact.

N. Luță-Moldoveanu

1261. ȘANTA N. și BOTTESCH A., *Cercetări asupra unor lipaze ale crapului de cultură.* Studii și cercet. biol., biol. anim., 1961, **XIII**, *2*, 143—153.

Activitatea lipazei din intestin ficat, pancreas, mușchi și ser este influențată considerabil de temperatură, viteza maximă a lipolizei fiind obținută la 35 și 40°C. Hrana determină o creștere a activității lipazei, care atinge nivelul cel mai înalt după 15—20 de ore de la administrare. În cursul anotimpurilor, numai activitatea lipazei intestinale și cea a extractelor hepato-pancreatice manifestă variații foarte mari, lipaza serică își păstrează activitatea neschimbată.

N. Luță-Moldoveanu

1262. MOTELICĂ I., *Cercetări asupra reglajelor metabolismului glucidic la pești. Glicemia crapului* (Cyprinus carpio L.) (*Nota I*). Studii și cercet. biol., biol. anim., 1961, **XIII**, *2*, 257—266.

La crap, valorile normale ale glicemiei (între 40 și 110 mg%) scad sub limita inferioară în cursul unei inaniții prelungite. Diverși excitanți și administrarea unor prînzuri glucidice provoacă din prima oră o hiperglicemie intensă, cu punctul culminant după 6—12 ore, iar revenirea la normal are loc după 48—72 ore.

N. Luță-Moldoveanu

1263. VAISLER L., COSTINER E. și BIENER J., *Modificările unor indici biochimici la șobolanul alb cu ciroză experimentală, tratat cu hormon epifizar.* Studii și cercet. endocrinol., 1961, *1*, 125—126.

Hormonul epifizar administrat animalelor cu ciroză experimentală exercită asupra celulei hepatice o acțiune protectoare față de efectul toxic al CCl_4.

D. Cotariu

1264. CHIOSA L., DUMITRESCU S. şi VOICU ST., *Metoda cantitativă pentru cercetarea acţiunii iritante a medicamentelor injectabile şi a rubefiantelor.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *3*, 401—409.

Metoda este bazată pe sumarea acţiunii iritante a substanţei injectate, cu durerea provocată de un agent fizic dozabil (căldură de o anumită intensitate aplicată în acelaşi punct pe pielea animalului). Prin compararea intervalului de timp pînă la apariţia reacţiei provocate de durere, înainte şi după acţiunea injecţiei produsului respectiv, se stabileşte acţiunea iritantă din punct de vedere cantitativ. Autorii au lucrat pe şoareci şi şobolani, folosind ca substanţe rubefiante *„ol. sinapis"* şi nicotinatul de etil, iar dintre medicamente injectabile histamina, serotonina, vitamina B_1 şi sarea sodică şi potasică a penicilinei G cristaline. Au cercetat de asemenea şi rolul presiunii osmotice şi al pH-ului.

H. D. Schell

1265. MARCU C., DOBRESCU D., MANOLESCU E. şi MANUCHIN M., *Influenţa hidroxizinei, benactizinei şi fenobarbitalului asupra unor efecte secundare ale fenilbutazonei.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *3*, 433—438.

Din cercetările efectuate pe şobolani albi reiese că acţiunea ulcerigenă a fenilbutazonei este diminuată prin asocierea acesteia cu benactizină, hidroxizină şi fenobarbital. Acţiunea cea mai intensă se observă la asocierea cu fenobarbital, iar cea mai slabă la asocierea cu benactizină. Scăderea efectului ulcerigen este probabil rezultatul unui antagonism exercitat la nivelul hipotalamusului, între fenilbutazonă pe de o parte şi benactizină, hidroxizină sau fenobarbital pe de altă parte.

H. D. Schell

1266. CÎRSTEA M., SCHIAU S., STOENESCU R. şi SUHACIU GH., *Cercetări privind efectul iradierilor cu raze X asupra şocului anafilactic la cobai.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *3*, 455—460.

Iradierea cobailor sensibilizaţi la ser de cal, cu doze mici şi mijlocii de raze X, în aplicare unică sau fracţionată între a 27-a şi a 31-a zi de la sensibilizare, nu modifică semnificativ mortalitatea în şocul anafilactic declanşat la 24 ore de la iradierea unică sau, în cazul aplicării fracţionate, la 24 ore de la ultima iradiere. O dată sensibilizarea instalată, susceptibilitatea animalului la procesul anafilactic nu se modifică prin iradierea cu raze X în doze comparabile cu utilizarea clinică.

H. D. Schell

1267. FAIBIŞ A., *Studiul comparativ al modificărilor produse de histamină şi serotonină asupra circulaţiei pulmonare.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *3*, 475—486.

Lucrînd pe 35 cîini adulţi şi înregistrînd simultan un număr de 4—6 indicatori din circulaţia generală şi pulmonară, autorul scoate în evidenţă cu ajutorul efectelor obţinute prin

administrare de histamină și serotonină — situația funcțională particulară a patului vascular pulmonar ca teritoriu de tamponare și amortizare a tendințelor de dezechilibru hemodinamic de diverse origini.

H. D. Schell

1268. CÎRSTEA M., SUHACIU GH. și SĂHLEANU V., *Cercetări asupra relației dintre cantitatea de precipitine din sîngele circulant și intensitatea șocului anafilactic la cîine.* Studii și cercet. fiziol., 1961, VI, *3*, 495—503.

Cercetîndu-se în paralel intensitatea șocului anafilactic și intensitatea reacției de precipitare la un lot de 59 cîini, din care 49 sensibilizați la ser de cal și 10 martori nesensibilizați, s-au făcut următoarele constatări : există cazuri în care se produce reacția anafilactică de diferite grade, fără ca precipitinele din ser să fie decelabile ; există cazuri în care, cu toate că precipitinele sînt prezente în sîngele circulant, injecția declanșatoare nu provoacă nici un fel de șoc. Analiza statistică a rezultatelor a arătat că există o corelație pozitivă semnificativă ($r = 0{,}60$; $p > 0{,}001$) între intensitatea șocului anafilactic și cantitatea de precipitine din sîngele circulant.

H. D. Schell

1269. STERESCU N., ROSNER B. și STANCU A., *Cercetări asupra mecanismului modificărilor concentrației acetilcolinei în glanda tiroidă în cursul efortului fizic.* Studii și cercet. fiziol., 1961, VI, *3*, 505—510.

Cercetări efectuate pe 47 cobai masculi adulți, împărțiți în mai multe loturi, au arătat că efortul fizic prin înot timp de 90 min determină constant creșterea concentrației acetilcolinei legate de proteine în glanda tiroidă ; valorile obținute sînt însă mai mici decît cele observate la animalele supuse efortului și ținute apoi 60 min în repaus. Blocarea prealabilă prin tiroxină a excreției hormonului tireotrop endogen reduce considerabil, în unele cazuri pînă la anulare, creșterea concentrației acetilcolinei legate în tiroidă, ceea ce dovedește că stimulul tireotrop endogen are un rol în activarea metabolismului colinergic tiroidian din cursul efortului fizic.

H. D. Schell

1270. CARP N., DUMITRIU D. și DRAGOTESCU C., *Biologia procesului de scleroză. IV. Aspecte morfologice și histochimice ale reactivității precoce a rinichiului restant după nefrectomie experimentală.* Studii și cercet. med. int., 1961, II, *4*, 571—579.

S-au studiat pe iepuri și șoareci modificările rinichiului restant după nefrectomie totală unilaterală. S-a constatat că după 24 și 48 ore de la nefrectomie, are loc un reflex vasoconstrictor arterio-glomerular, însoțit de o scădere apreciabilă a fosfatazei alcaline. După 7 zile

se constată o revenire hemodinamică şi enzimatică, iar după 14 zile apar primele semne de hipertrofie compensatoare a rinichiului restant. Acumulările de mucopolizaharide în interstiţii şi membranele bazale preced hiperplazia conjunctivă care se dezvoltă treptat, constituind scleroza difuză a rinichiului.

C. Iordache

1271. COSTA-FORU D., *Modificările cuprului din creier, ficat, rinichi, splină şi sînge determinate de accesul convulsiv experimental la şobolani.* Studii şi cercet. neur., 1961, **VI**, *1*, 125—129.

După electroşoc, cantitatea de cupru a crescut semnificativ în creier, a scăzut nesemnificativ în ficat şi rinichi şi a crescut nesemnificativ în sîngele total.

N. Luţă-Moldoveanu

1272. CUPARENCU B., BÎRSAN E. T. şi GĂVRUŞ AL., *Studiul electroforetic al proteinelor miocardice în insuficienţa suprarenală experimentală.* Studii şi cercet. Cluj, med., 1960, *1*, 79—84.

Se cercetează cauzele hipodinamiei miocardice în insuficienţa suprarenală experimentală. În miocardul animalelor suprarenalectomizate se constată scăderea miogenului, creşterea fracţiunii corespunzătoare fosforilazei, creşterea mioglobinei şi a globulinei X. Se mai observă creşteri ale mioalbuminei şi scăderea proporţiei de miogen faţă de fracţiunea actomiozinică. Se discută importanţa acestor factori.

C. Gurban

1273. COMOROŞAN S., *Cercetări experimentale asupra exosmozei electroliţilor din piele.* Fiziol. norm. pat., 1960, *1*, 55—58.

Autorul aplică la animale, tehnica de determinare a exosmozei electroliţilor din piele prin urmărirea conductibilităţii electrice, elaborată de acad. E. Macovschi şi Comoroşan, şi urmăreşte acţiunea unor medicamente ca luminalul, atropina, eserina, novocaina administrate în prealabil animalului.

E. Cristea

1274. SZABÓ ST., MÓDY E. şi SZÉKELY I., *Comportarea lipoproteinelor serice la animale tratate cu acid silicic administrat parenteral.* Fiziol. norm. pat., 1960, *3*, 143—148.

Se studiază acţiunea acidului silicic asupra proteinelor, lipoproteinelor şi colesterolului din sînge, precum şi efectul ACTH-ului şi DOC-ului. Bioxidul de siliciu administrat intraperitoneal provoacă la cobai hiperlipemie; administrarea simultană de ACTH şi DOC accentuează

acest efect, iar cortizonul îl micşorează. Acidul silicic coloidal administrat intravenos la iepuri, determină o disproteinemie şi o hiperlipemie. Cortizonul nu influenţează aceste modificări. Bioxidul de siliciu provoacă la cobai hipercolesterolemie.

E. Cristea

1275. PAVEL I., SDROBICI D., CHIŞIU N., TĂNĂSESCU N. şi MIHALACHE N., *Acţiunea sulfonamidei hipoglicemiante D860 pe secţiuni de organe de şobolani.* Med. int., 1961, **XIII**, *9*, 1245—1248.

S-a constatat că această sulfonamidă inhibă glicoliza aerobă la nivelul ficatului, rinichiului şi miocardului şi nu are efect asupra celei musculare, inhibă glicogenoliza hepatică şi stimulează puternic glicoliza anaerobă la nivelul ficatului de şobolan.

C. Şelariu

1276. NICOLAU T. C., APĂTEANU V., NICOARĂ S., GRIGORIU GR., GRISOTTI FL. şi RĂDULEANU ŞT., *Refacerea hematopoezei cu ajutorul măduvei osoase autologe conservate în glicerol la —76°C la câini trataţi cu* ^{39}E. Med. int., 1961, **XIII**, *10*, 1431—1439.

Măduva osoasă de câine conservată în glicerol la —76°C timp de 10 zile, şi-a păstrat viabilitatea celulară, iar după readministrare a produs un efect protector asupra animalelor tratate cu doză letală de ^{39}E. Efectul protector s-a manifestat printr-o refacere hematopoetică şi o supravieţuire de 50%. Rezultatele demonstrează că măduva osoasă care suferă acţiunea unui agent chimioterapic, poate fi restaurată cu o cantitate relativ mică din aceeaşi măduvă, scoasă de sub acţiunea chimioterapicului.

C. Şelariu

1277. GONŢEA I., DUMITRACHE S., IZVORANU Z. şi PAMBUCCIAN G., *Importanţa proteinelor pentru rezistenţa organismului faţă de o substanţă toxică (fenilhidrazina).* Med. int., 1961, **XIII**, *11*, 1529—1541.

S-au făcut cercetări pe 60 şobolani împărţiţi în 3 loturi, unul cu regim normoproteic (lotul 1), celelalte două cu regim hipoproteic. După administrarea fenilhidrazinei, un lot a fost trecut la regim normoproteic (lotul 2) iar celălalt (lotul 3) a fost lăsat în continuare la regimul hipoproteic. S-au determinat greutatea corporală, hemoglobina, numărul de hematii şi de reticulocite, substanţa uscată şi lipidele din ficat. Pierderea în greutate a fost mult mai puţin accentuată la lotul 1. Evoluţia intoxicaţiei a variat cu cantitatea de proteine din regim, făcînd ca animalele din lotul 3 să se comporte ca cele din lotul 1.

C. Şelariu

1278. DINCĂ C., *Cercetarea histochimică a polizaharidelor în elementele albe din sîngele periferic al unor animale de laborator.* Morfol. norm. pat., 1961, *1*, 55—62.

Cercetări comparative asupra localizării polizaharidelor în leucocitele sîngelui periferic de broaşte, păsări, şoareci, şobolani, cobai, iepuri, cîini şi pisici au arătat variaţii de conţinut în funcţie de specie, alimentaţie şi vîrstă.

D. Cotariu

1279. EPERJESSY A., KISS A., CZEGEDI J., NEMES L. şi VEREPH J., *Cercetări comparative între lipoproteidele creierului bovin şi ale creierului păsărilor de curte.* Rev. medic. Tg. Mureş, 1960, **VI**, *4*, 458—464.

Lipoproteinele bovine diferă de acelea ale păsărilor de curte prin cantitatea de lipide, protide şi prin aminoacizi. Aceste diferenţe structurale se manifestă în efectul pe care lipoproteinele studiate l-au exercitat asupra oxidării biologice. Acest efect diferit este atribuit, conform unor lucrări anterioare, varietăţii lipidelor şi totodată mărimii şi structurii moleculelor proteice.

D. Moţet-Grigoraş

1280. ПОРА Е. А., РОШКА И. Д. и РУШДЯ Д., *Поглощение тканями $^{32}PO_4H_2Na$ введенного в венозную кровь кур породы Род-Айланд.* Revue biol., 1960, **V**, *1—2*, 111—117.

Reînoirea ^{32}P introdus în sîngele de găină are loc după o curbă exponenţială avînd 3 etape: una rapidă (75% în circa 20 circuite sangvine complete), una lentă (15% în circa 40 circuite) şi una extrem de înceată (10% în circa 180 circuite). Blocarea sistemului parasimpaticului determină grăbirea dispariţiei ^{32}P din sînge sub acţiunea sistemului simpatic. Blocarea sistemului simpatic, invers, duce la o uşoară încetinire a acestei eliminări. Reînoirea zincului are loc tot după o curbă exponenţială, cu o primă fază foarte rapidă şi o a treia foarte prelungită.

D. Moţet-Grigoraş

1281. PORA E. A., OROS I., REJEP A., *Le rôle du système nerveux dans la répartition du $^{32}PO_4H_2Na$ dans les organes viscéraux et dans l'utilisation de cette substance par les muscles.* Revue biol., 1960, **V**, *3*, 193—206.

În absenţa inervaţiei pneumogastrice, la şobolan creşte fixarea ^{32}P de către inimă, rinichi, pancreas şi suprarenale, pe cînd fixarea lui de către plămîn, ficat, splină scade. Broaştele spinalizate pierd fosfat proporţional cu creşterea temperaturii mediului ambiant. Aceasta arată că la poikiloterme paralelismul între temperatură şi metabolism este reglat de encefal. Gastrocnemianul obosit fixează mai mult ^{32}P decît cel aflat în repaus. Cînd sciaticul e secţionat

se fixează mai mult ^{32}P în primele 3 ore apoi fixarea scade sub aceea a mușchiului intact. La broască și la șobolan adaptarea metabolismului muscular sau al organelor interne la factorii de mediu este reglată de către centrii encefalici.

D. Moțet-Grigoraș

1282. ДИНУ М., ПЭДУРАРУ И. и АПОСТОЛ Г., *Влияние синтетических экстрогенных веществ на развитие поперечно-полосатых мышечных волокон.* Revue biol., 1961, **VI**, *1*, 71—80.

Substanțele de sinteză cu acțiune estrogenă introduse parenteral la scroafe în creștere, determină reținerea dezvoltării țesutului muscular striat. Efectul dereglării endocrine prin introducerea substanțelor estrogene sintetice de tip stilbenic se menține timp îndelungat. Castrarea în luna a 5-a determină o slabă încetinire a ritmului de creștere a diametrului fibrelor mușchiului psoas major. Compoziția chimică a fibrelor musculare striate este foarte puțin influențată de substanțele estrogene sintetice.

D. Moțet-Grigoraș

1283. VLĂDESCU C., *Recherches sur la régulation du métabolisme glucidique chez les amphibiens. I. Glycémie normale et hyperglycémie provoquée chez* Rana ridibunda. Revue biol., 1961, **VI**, *2*, 169—176.

Glicemia prezintă valori aproximativ de 30 mg% la animalele în inaniție. Transportul și manipularea nu aduc modificări importante. După administrarea de glucoză în sacii limfatici glicemia crește puternic și rapid, dar nu durează decît cîteva ore, reglarea făcîndu-se pe cale metabolică; pe cale renală nu se elimină decît aproximativ 10%.

D. Moțet-Grigoraș

1284. ДИНУ М., ПОРА Л. И ПЭДУРАРУ И., *Функциональные корреляции щитовидной железы с белковыми фракциями, глутатионом крови и нуклеиновыми кислотами печени кролика.* Revue biol., 1961, **VI**, *3*, 251—260.

Hipo- și hiperfuncția tiroidei determină mărirea conținutului fracțiunilor globulinice și scăderea corespunzătoare a albuminelor în plasmă. Aceste modificări pot fi un indicator al funcției tiroidei. Cantitatea de glutation din sîngele iepurilor scade în hipo- și crește în hipertiroidism, putînd indica intensitatea proceselor de oxidare la nivelul țesuturilor. În hiperfuncția tiroidiană, acidul ribonucleic din ficat crește de 3 ori, iar acidul desoxiribonucleic scade cu 50%. În hipofuncție, acidul desoxiribonucleic crește cu 20%, în timp ce acidul ribonucleic nu prezintă variații sensibile față de martori.

D. Moțet-Grigoraș

1285. VASILESCU E., *Observații asupra glicemiei crapului de cultură.* An. Univ. „C. I. Parhon", șt. nat., 1960, *24*, 169—176.

Glicemia normală variază în limite foarte largi : 37—105 mg%. Iarna glicemia scade cu 23%. După administrare de glucoză pe cale intestinală, glicemia crește de 3—4 ori, vara după 3 ore și iarna după 24 ore, revenind apoi la normal după câteva zile. Nivelul crescut al glicemiei nu produce tulburări în comportarea animalelor.

D. Moțet-Grigoraș

1286. PICOȘ C. A., *Cercetări asupra acțiunii dinamice specifice a proteinelor la crap.* An. Univ. „C. I. Parhon", șt. nat., 1960, *24*, 177—184.

La puietul de crap ținut în prealabil la post 10 zile, se constată o evidentă creștere a metabolismului după consumul unei hrane proteice. Durata acțiunii dinamice specifice a proteinelor este mai lungă în cazul evaluării ei după consumul de oxigen și mai scurtă în cazul luării în considerație a bioxidului de carbon degajat. Citul respirator se modifică numai în mică măsură.

D. Moțet-Grigoraș

X. BIOCHIMIE MEDICALĂ

1287. NIȚESCU I., CONSTANTINESCU A. și MIHĂIȚĂ M., *Electroforeza pe hîrtie în ocluzia intestinală.* Studii și cercet. fiziol., 1961, **VI**, *3*, 523—525.

Urmărind modificările spectrului electroforetic al proteinogramei, lipidogramei și glucidogramei în 7 cazuri de ocluzie intestinală, autorii constată înaintea intervenției chirurgicale o creștere masivă a fracțiunii γ-globulinice și o creștere moderată a β-globulinelor, în detrimentul fracțiunii albuminice. După intervenția chirurgicală, alături de aceste modificări se observă o creștere a fracțiunii α_2 - pe seama β-globulinelor. Glucidograma indică o creștere a subfracțiunii α_2-glucoproteice, înainte și la scurt timp după operație, iar lipidograma o creștere ușoară în unele cazuri a β-lipoproteinelor. Modificările fracțiunii γ-globulinice și albuminice se regăsesc chiar după 60—70 zile de la intervenția chirurgicală.

H. D. Schell

1288. VELICAN C., MICU D., GROZEA P. și GOCIU M., *Histochimia complexelor glucido-proteice în hemopatiile maligne. II. Cercetări în reticuloze, reticulosarcoame și limfosarcoame.* Studii și cercet. med. int., 1961, **II**, *4*, 517—525.

S-au cercetat histochimic complexele glucido-proteice din mastocitele ganglionilor limfatici de la bolnavi cu reticuloze, reticulosarcoame și limfosarcoame. În reticuloze apar variații cantitative între compușii de tip heparinic și cei de tipul acidului hialuronic, precum și acumulări de mucopolizaharide neutre și proteine bogate în triptofan și tirozină.

C. Iordache

1289. MICU D., GROZEA P., MAXIMILIAN S., SAFIRESCU E., GOCIU M. şi MATEESCU D., *Contribuţii la studiul citologic şi enzimocitochimic al ganglionului normal şi patologic. III. Ganglionul de inflamaţie cronică.* Studii şi cercet. med. int., 1961, **II**, *4*, 527–537.

Cercetările făcute pe 74 ganglioni prinşi în cadrul diferitelor procese septice cronice ca tuberculoza, lues şi alte stări infecţioase au arătat că 70% din aceşti ganglioni au fost în hiperactivitate limfocitară şi că există o creştere a acizilor ribonucleici.

C. Iordache

1290. VELICAN D., RUNCAN V. şi CONSTANTINOVICI A., *Biologia procesului de scleroză. V. Cercetări în forma cronică a hepatitei epidemice.* Studii şi cercet. med. int., 1961, **II**, *4*, 561–569.

Pe fragmente de ţesut hepatic recoltate de la bolnavi cu diagnosticul de formă cronică a hepatitei epidemice s-au studiat modificările histochimice ale complexelor glucidoproteice care precedă leziunile de scleroză difuză. S-a constatat că aceste modificări încep prin alterări calitative, care duc la mărirea numărului de grupări reactive libere, capabile să fixeze radicali sulfat. Se remarcă o acumulare de acizi ribonucleici, mucopolizaharide neutre, proteine Millon pozitive şi PAS pozitive etc., ca şi absenţa acumulărilor de mucopolizaharide acide.

C. Iordache

1291. LUPU N. GH., RUNCAN V., ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M., PAPPO A., MĂRCUŞ N., MIRON C., VELICAN D., URSEA N. şi VLĂDESCU C., *Valoarea comparativă a unor teste enzimatice cu alte teste biologice şi chimice în diagnosticul precoce al hepatitei cronice postvirotice.* Studii şi cercet. med. int., 1961, **II**, *5*, 653–661.

S-a stabilit valoarea comparativă a unor teste enzimatice (aldolazemia, transaminazele piruvică şi glutamică) faţă de alte mijloace chimice şi biologice folosite curent în urmărirea sechelelor parenchimatoase ale hepatitei virotice acute. Cercetările efectuate pe 526 pacienţi au arătat că aldolazemia este cel mai sensibil test, urmat de transaminazemia piruvică. Se consideră că discordanţa de sensibilitate dintre testele de disproteinemie şi testele enzimatice se datoreşte faptului că primele traduc reacţia mezenchimului, pe cînd celelalte exprimă starea celulară.

C. Iordache

1292. STOICHIŢĂ M., CIOBANU V. şi GHEORGHIU M., *Acţiunea antigenelor streptococice asupra factorilor coagulării. Studii* in vitro. Studii şi cercet. med. int., 1961, **II**, *5*, 693–698.

Polizaharidul C şi corpii microbieni au un efect accelerator asupra coagulării sîngelui *in vitro*. Modificările produse de polizaharidul C sînt similare celor întîlnite în unele cazuri de boală reumatismală : hipercoagulare şi, paralel, o lipsă de utilizare a protrombinei. Această acţiune a polizaharidelor pare să se exercite prin intermediul modificării fibrinogenului care, în aceste condiţii, devine uşor precipitabil.

C. Iordache

1293. MISON-CRIGHEL N., COSTA-FORU D. şi MARINCHESCU C., *Influenţa supraîncărcării cu fosfaţi asupra nivelului unor compuşi fosforici din sîngele şi urina epilepticilor cu şi fără tulburări psihice.* Studii şi cercet. neur., 1961, **VI**, *1*, 79—92.

Supraîncărcarea cu o cantitate mare de fosfor (3 g într-o singură priză) determină din prima oră, la epileptici, o creştere semnificativă a fosforului anorganic din sînge, la martori creşterea producîndu-se în 2—3 ore. Raportul fosfor reabsorbit/fosfor filtrat scade semnificativ numai la bolnavii de epilepsie, iar raportul între coeficientul de erupţie al fosforului şi coeficientul de erupţie al creatininei creşte paralel cu creşterea fosforului anorganic din sînge, atît la martori cît şi la bolnavi. Fosforul excretat creşte semnificativ timp de 3 ore (de la supraîncărcare) numai la epilepticii cu tulburări psihice.

N. Luţă-Moldoveanu

1294. MISON-CRIGHEL L., PINTILIE C., CONSTANTINESCU E., LUCA N. şi SOLOMONOVICI A., *Cercetări biochimice în nevroza astenică.* Studii şi cercet. neur., 1961, **VI**, *2*, 283—290.

S-au constatat tulburări metabolice ale asimilării şi utilizării periferice a glucozei, utilizarea normală a substanţelor proteice, alterarea unor trepte intermediare ale metabolismului glucido-fosforic, dezechilibrul unor electroliţi (mai ales Na şi K), deficienţa unor procese de oxido-reducere (modificări ale glutationemiei, ceruloplasminei şi sistemului lactico-dehidrogenază). S-au constatat de asemenea unele corelaţii clinico-biochimice ca : alterarea mai accentuată a toleranţei la glucoza injectată intravenos, la bolnavii mai vechi, alterarea mai evidentă a metabolismului glucidic (după administrare orală) la bolnavii constituţionali şi mărirea mobilităţii potasiului în timpul acţiunii insulinei la bolnavii cu etiologie psihogenă.

N. Luţă-Moldoveanu

1295. COSTA-FORU D., *Influenţa efortului fizic asupra nivelului cuprului sangvin în nevroza astenică.* Studii şi cercet. neur., 1961, **VI**, *2*, 319—323.

Cupremia medie este mai mare la femei decît la bărbaţi, atît la martori cît şi la nevrotici. În nevroza astenică se constată numai la bărbaţi scăderea cuprului sangvin sub limita normală. După efort (proba Shellong), nivelul cuprului sangvin scade semnificativ atît la martori, cît şi la bolnavi.

N. Luţă-Moldoveanu

1296. NANA A., MIRCIOIU C., NEUMAN E., MARTIN P., GROZA A. şi MAREŞ A., *Unele aspecte ale biochimismului proceselor supurative.* Studii şi cercet. Cluj, med., 1960, *1*, 53—64.

Plecînd de la observaţia că unele focare supurative sînt complet sterile şi că antibioticele nu au nici o influenţă asupra evoluţiei proceselor respective, autorii iau în studiu unii factori de interes general cum sînt proteinemia, concentraţia ionilor minerali în sînge şi alţii, găsind că în cazul supuraţiilor localizate prelungite apare hipoalbuminemia, hiperalfa- şi hipergamaglobulinemia, scăderea concentraţiei potasiului şi sodiului în ser, pe cînd concentraţia calciului rămîne în limitele normale.

C. Gurban

1297. FODOR O., BORDA M., MANASIA M. şi SZANTAY I., *Cercetări asupra acţiunii amoniofixatoare a acidului aspartic în afecţiunile hepatice.* Studii şi cercet. Cluj, med., 1960, *?*, 359—368.

Acidul aspartic are o capacitate amoniofixatoare mai mare decît acidul glutamic sau decît arginina, exercitînd în acelaşi timp o acţiune favorabilă asupra evoluţiei afecţiunilor hepatice. Indicaţia terapeutică a acidului aspartic este pentru accidentele de encefalopatie hepatoportală. Capacitatea amoniofixatoare a acidului aspartic este completată, în tratamentul comelor hepatice, cu cea de favorizare a proceselor de refacere hepatocelulare.

C. Gurban

1298. ENE-POPESCU C., *Manifestări alergice datorită meprobamatului.* Dermatovener., 1961, **VI**, *5*, 443—445.

Se semnalează trei cazuri care întrunesc majoritatea reacţiilor alergice provocate de meprobamat, medicament cu utilizare pe scară din ce în ce mai largă şi difuzat la noi sub numele de carbaxin.

H. D. Schell

1299. OŢELEANU D. şi GANE P., *Medicamente tranchilizante (2). II. Derivaţi de fenotiazină.* Farmacia, 1960, **VIII**, *5*, 353—370.

Acţiunea n-oblivonului asupra activităţii reflex condiţionate depinde de doza administrată. Prin asociere, n-oblivonul potenţează acţiunea alcoolului etilic şi măreşte antagonismul între cafeină şi alcool. Frenquelul administrat oral în doze între 3,5—7 mg/kilocorp ameliorează posibilitatea de fixare a reflexelor condiţionate şi are o acţiune sinergică cu a cafeinei şi anta-

gonică față de alcool. Miltoronul micșorează activitatea reflex condiționată abia în doze de 100—200 mg/kilocorp. La unele animale, prin asociere de meprobamat cu cafeină, se obține o ameliorare a fixării reflexelor condiționate. Meprobamatul potențează alcoolul etilic.

D. Moțet-Grigoraș

1300. BUKARESTI L., KASZA L., HADNAGY CS., CSIKI N. I. și HANTZ A., *Cercetări în legătură cu valoarea clinică a metodei polarografice (Cercetări în domeniul medicinii interne)*. Med. int., 1961, **XIII**, *7*, 1027—1036.

S-a determinat unda catalitică a filtratului serului deproteinizat la 521 bolnavi de diverse maladii. Scăderea undei catalitice observată aproape constant în afecțiunile hepatocelulare, apare cu regularitate și în nefroze. Se insistă asupra folosirii metodei polarografice în afecțiunile hepatobiliare și în nefropatiile cu tulburări ale metabolismului protidic.

C. Șelariu

1301. SPÎRCHEZ T., STOICHIȚĂ S., TACORIAN S., BROȘTEANU E., RUSSU M., GHEORGHESCU B., DULGHERU C., VÎLCU AL., MERCULIEV E., MARINESCU E., STECLACI A., VÎNTU A., CRIȘAN A., BUȘNEAG C., NAN-VASILESCU FL., MIHĂILESCU M., VLĂDESCU N. și VASILESCU V., *Cercetări privind insuficiența hepatică și rolul factorilor neuro-endocrini și infecțioși în patologia hepatobiliară*. Med. int., 1961, **XIII**, *8*, 1097—1106.

S-au studiat clinic, pe 168 bolnavi, cele trei forme de insuficiență hepatică (mică, mare și precomă) și coma hepatică, precum și puncția biopsică hepatică, disproteinemia, electroforeza, cromatografia, coagularea, testul lui Schilling, electroliții, radiografia gastrointestinală, B.S.P., amonemia și electroencefalografia.

C. Șelariu

1302. FODOR O., NICOARĂ GH. și PĂRĂU N., *Cercetări asupra tulburărilor de circulație periferică prin crioglobulinemie și aglutinine la rece*. Med. int., 1961, **XIII**, *9*, 1249—1261.

S-au cercetat 11 cazuri de tulburări de circulație periferică, prin circulația capilară, examenul hematologic, proteinogramă, proteine crioprecipitabile, cercetări imunologice, anticorpi la cald și rece. Concluzia autorilor este că tulburările circulatorii periferice de tipul sindromului Raynaud pot avea o cauză umorală prin două mecanisme : apariția proteinelor crioprecipitabile sau autoîntreținerea imunologică cu anticorpi antieritrocitari la rece. Diagnosticul diferențial între cele două mecanisme se poate face prin investigații serologice.

C. Șelariu

1303. PĂUNESCU-PODEANU A., IEPURE V., BERINDE L., DANCĂU G. şi GSERNICK I., *Unele date cu privire la modificările constantelor sangvine în cancerul bronho-pulmonar şi la valoarea lor pentru diagnostic.* Med. int., 1961, **XIII**, *9*, 1281—1287.

Pe 81 bolnavi s-au determinat VSH, hematiile, leucocitoza, leucograma, proteinele sangvine. Concluzia este asocierea modificărilor la toate constantele sangvine, plus febra; în acest caz, probabilitatea cancerului bronho-pulmonar creşte apreciabil, mai ales dacă modificările coroborează datele clinice.

C. Şelariu

1304. POPPA C., POPA I., PETRIŞ I. şi DUMITRESCU D., *Plasma filtrată, reactiv pentru testarea activităţii factorului VII al coagulării.* Med. int., 1961, **XIII**, *10*, 1439—1445.

Autorii au separat plasmă filtrată (deproconvertinizată) prin filtrare pe Columbit SK şi au conservat-o prin congelare şi liofilizare. Atît congelarea cît şi liofilizarea ameliorează valoarea de reactiv a plasmei filtrate. Metodele de conservare nu modifică conţinutul în factor V al plasmei filtrate. Determinările activităţii factorului VII au dat rezultate identice şi normale la plasma conservată.

C. Şelariu

1305. GEORGESCU I. ST., KÖPPICH F. şi KARASSI A., *Timpul de apariţie al bromsulfaleinei (B.S.F.) în duoden (proba Caroli-Tanasoglu) în diagnosticul diferenţial al unor afecţiuni hepato-biliare.* Rev. medic. Tg. Mureş, 1960, VI, *4*, 409—413.

Se studiază utilitatea clinică a testului pe 12 cazuri. Rezultatele obţinute sînt în concordanţă cu datele din literatură.

D. Moţet-Grigoraş

1306. FALL S., MÁLNÁSI G. şi GYÖRGY P., *Observaţiile noastre privind împachetările cu sulf la bolnavii reumatici.* Rev. medic. Tg. Mureş, 1960, **VI**, *4*, 428—431.

S-au obţinut succese în poliartrita cronică evolutivă. Sulful se resoarbe prin piele, în timpul unui tratament de 20—40 zile, sulfemia putînd să crească cu 140%. Tratamentul, spre deosebire de cel balnear, e lipsit de efecte nedorite. În poliartrita cronică evolutivă, acest tratament potenţează considerabil efectul terapeutic al cortizonului.

D. Moţet-Grigoraş

1307. UNTEANU GH., CRISTEA M., NICULESCU V. şi CHELARU C., *Aspecte electroforetice în unele pneumopatii cronice.* Viaţa med., 1961, *21*, 1173—1178.

În pneumopatiile cronice electroforeza nu aduce în general o contribuţie utilă în sprijinul diagnosticului. Exprimînd mai mult o reacţie a organismului decît caracterele leziunii, electroforeza sprijină însă diagnosticul diferenţial în cazul tuberculozei şi al cancerului bronhopulmonar. Prin relevarea gradului de disproteinemie se obţin de asemenea informaţii asupra gravităţii bolii şi a prognosticului. Prin explorarea ansamblului proteinelor serice, se pot obţine date asupra stării hepatorenale a bolnavilor ce urmează să sufere intervenţii chirurgicale. Electroforeza aduce indicaţii utile referitoare la gradul de stabilizare a leziunii tuberculoase şi asupra capacităţii de muncă la bolnavii recuperaţi.

D. Moţet-Grigoraş

1308. CIUDNOVSKI G. S., *Influenţa eufilinei asupra excreţiei urinare a apei şi electroliţilor la bolnavii cu insuficienţă circulatoare.* An. rom.-sov., med., 1961, *5*, 153—161.

După injectarea eufilinei se constată întotdeauna o intensificare a excreţiei de apă, clor, şi sodiu, precum şi modificarea ritmului zilnic al acestor excreţii.

D. Moţet-Grigoraş

1309. ASTAPENKO M. G., TROFIMOVA T. M., PIHLAK E. G. şi STAROTORJOKAIA L. L., *Tratamentul poliartritei infecţioase nespecifice cu preparate hormonale asociate cu preparate de aur.* An. rom.-sov., med., 1961, *5*, 162—169.

Se obţin rezultate mai durabile decît cu preparatele hormonale asociate cu salicilat sau preparate pirazolonice. Această terapie are o acţiune normalizantă asupra indicilor biochimici şi imunologici. Tratamentul se face sub control, datorită posibilităţii apariţiei fenomenelor secundare.

D. Moţet-Grigoraş

XI. BIOCHIMIA NUTRIŢIEI

1310. ASLAN A., DAVID C., CHISU N. şi CÎMPEANU S., *Studiul acţiunii procainei (gerovital H_3) asupra disproteinemiei din unele carenţe nutritive experimentale ale purcelului.* Fiziol. norm. pat., 1960, *2*, 89—98.

Se studiază acţiunea procainei asupra disproteinemiei induse experimental la purcel prin administrarea unor raţii maidice. Administrarea de procaină la animale care primesc o raţie pelagrogenă are ca efect instaurarea unui ritm de creştere normal şi reechilibrarea proteinelor serice.

E. Cristea

1311. MIHAI C., TEODORESCU GH., DONA D. şi MILCU V., *Raportul dintre datele cromatografice ale aminoacizilor din serul sangvin şi din urina bolnavilor cu diferite dezechilibre alimentare.* Fiziol. norm. pat., 1960, *2*, 107—110.

Se determină cromatografic aminoacidemia şi aminoaciduria la bolnavi cu diferite dezechilibre alimentare. În toate cazurile studiate, aminoaciduria este mult crescută, eliminîndu-se în primul rînd aminoacizi esenţiali şi aminoacizi cu sulf. Concentraţia aminoacizilor în sînge este mai mică în toate cazurile, în afară de cele de dezechilibru alimentar ale bolnavilor hepatici şi renali.

E. Cristea

1312. KOVALSKI V. V., *Problemele de bază ale biochimiei în zootehnie.* An. rom.-sov., agr.-zoot., 1961, **XV**, *3* (*61*), 136—145.

Se schiţează căile pe care trebuie să se orienteze cercetările în domeniul sintezei grăsimilor şi proteinelor animale, al compoziţiei hranei animalelor şi al conservabilităţii fermenţilor.

C. Săndulescu

1313. POPOV I. S., *Problema aminoacizilor în alimentaţia animalelor domestice.* An. rom.-sov., agr.-zoot., 1961, **XVII**, *4* (*62*), 164—178.

Simultan cu revizuirea bazelor ştiinţifice ale determinării cerinţelor în proteine ale animalelor, este necesar să se perfecţioneze modul de apreciere a valorii proteice a nutreţurilor, respectiv a conţinutului în aminoacizi esenţiali, precum şi să se treacă la aplicarea raţională a aminoacizilor sintetici, mai ales metionina şi lizina, în nutreţurile combinate, pentru păsări şi porcine.

C. Săndulescu

XII. BIOCHIMIE TEHNICĂ

1314. VASILESCU I., STERNBERG M., BÎRLĂDEANU R. şi TUCIKOV E., *Producerea microbiologică de suplimente vitaminice pentru creşterea animalelor.* Lucr. şt. Centr. exp. de îngrăş. bact., 1960, **II**, 295—301.

Lucrarea se referă la obţinerea prin biosinteză a unui supliment vitaminic cu conţinut preponderent de vitamină B_{12}, pentru uz zootehnic, prin creşterea unei ciuperci producătoare

de vitamină B_{12}, *Eremothecium ashby*, pe un mediu solid. Suplimentele vitaminice au fost realizate şi în condiţii semiindustriale.

C. Săndulescu

1315. ARVANITOPOL N., BOJOI C., ŢIGĂIERU N. şi SIMON M. D., *Studiu asupra conservabilităţii spermei de taur.* Probl. zoot. vet., 1961, *10*, 31—36.

Mediul diluant-conservant liofilizat pentru sperma de taur, compus din 1,4% citrat de sodiu, 3% glucoză şi 20% gălbenuş de ou, nu suferă prin liofilizare şi conservare ulterioară nici o modificare în ceea ce priveşte pH-ul, umiditatea reziduală, conţinutul în lecitină şi compoziţia în aminoacizi.

H. Filipescu

ŞEDINŢELE CERCULUI DE BIOCHIMIE GENERALĂ ŞI APLICATĂ AL INSTITUTULUI DE BIOCHIMIE AL ACADEMIEI R.P.R. ŞI CATEDREI DE BIOCHIMIE DE LA UNIVERSITATEA „C. I. PARHON"

În ziua de 30 octombrie 1961 a avut loc la Institutul de biochimie şedinţa prezidată de prof. H. Sluşanschi, cu următoarea ordine de zi:

1. L. M. Buruiană, E. Hadarag, A. Dema şi I. Dema (Facultatea de medicină veterinară): *Acţiunea unui flux radiant complex asupra fosfomonoesterazei eritrocitare.*
   Lucrarea s-a publicat în nr. 4 din 1961 al revistei.
2. V. Gheţie şi L. Buzilă (Institutul de biochimie): *Crioproteinele vegetale.*
   Lucrarea s-a publicat în nr. 1 din 1962 al revistei.
3. H. Marx (Institutul „Dr. Cantacuzino"): *Analiza cromatografică pe rezinele schimbătoare de ioni a aminoacizilor din anatoxina stafilococică purificată.*
   Lucrarea a fost publicată în nr. 4/1961 al revistei.

În ziua de 4 decembrie 1961 a avut loc la Institutul de biochimie şedinţa prezidată de acad. prof. E. Macovschi, cu următoarea ordine de zi:

1. L. M. Buruiană, V. Pavlu, I. Dema, C. Diaconescu şi A. Dema (Facultatea de medicină veterinară): *Cercetări polarografice şi electroforetice privind efectul unui flux de neutroni asupra soluţiilor de proteine serice.*
   Lucrarea a fost publicată în nr. 4 din 1961 al revistei.
2. S. Vasu (Institutul de biochimie): *Comportarea coacervatelor proteino-pectice în prezenţa poligalacturonazei.*
   Lucrarea a fost publicată în nr. 4 din 1961 al revistei.
3. C. Huluţă, C. Iordache, H. D. Schell, C. Constantinescu şi V. Benea (Institutul de cercetări forestiere şi Institutul de biochimie): *Răsărirea seminţelor şi metabolismul puieţilor de* Fraxinus Excelsior L., *rezultaţi din seminţele tratate cu soluţii radioactive de* ^{32}P.
   Lucrarea a fost publicată în nr. 4 din 1961 al revistei.

În ziua de 29 ianuarie 1962 a avut loc la Institutul de biochimie şedinţa prezidată de prof. Al. Ionescu-Matiu, cu următoarea ordine de zi:.

1. E. Macovschi, V. Frunzeti şi L. Botoşăneanu (Institutul de biochimie): *Factorii fizico-chimici şi metabolici în transportul soluţiilor în plante.*
Lucrarea a fost publicată în nr. 4 din 1961 al revistei.
2. V. Alexandrescu (Institutul de biochimie): *Localizarea activităţii amilazei şi invertazei pe fracţiunile proteice solubile din seminţele de porumb.*
Lucrarea a fost publicată în nr. 1 din 1962 al revistei.
3. G. Enăchescu şi A. Alexiu (Institutul de cercetări horti-viticole, Bucureşti-Băneasa): *Pigmenţii antocianici din struguri şi vin.*

Din datele literaturii a rezultat că strugurii speciei *Vitis vinifera* — cea mai importantă din punct de vedere alimentar — nu conţin decît monoglucozizi, iar hibrizii producători direcţi dau struguri în care sînt prezenţi predominant diglucozizii. Acest fapt permite diferenţierea celor două categorii de viţe, pe baza unei metode cromatografice de separare şi identificare a diglucozizilor. În lucrările proprii, prin separarea cromatografică a concentratelor de pigmenţi, s-au găsit diglucozizi şi în vinurile de *Vitis vinifera*, dar în cantităţi extrem de reduse comparativ cu vinurile de hibrizi producători direcţi. S-au studiat comparativ cinci metode cromatografice, pentru a se stabili care este metoda cea mai sensibilă, precum şi cea mai indicată din punct de vedere practic, pentru recunoaşterea diglucozizilor şi, în special, a diglucozidului malvidinei, în vederea diferenţierii vinurilor de *Vitis vinifera* de acelea de hibrizi producători direcţi. S-a constatat că pentru studiul pigmentaţiei antocianice, util în biologia speciei *Vitis vinifera*, este mai indicată metoda Bieber, iar pentru identificarea în serie a vinurilor de hibrizi producători direcţi, metoda Ribereau-Gayon.

În ziua de 28 februarie 1962 a avut loc la Institutul de biochimie şedinţa prezidată de prof. Al. Ionescu-Matiu, cu următoarea ordine de zi:

1. E. Macovschi (Institutul de biochimie): *Unele aspecte ale cercetării biochimice în domeniul hibridării vegetative a plantelor.*
Lucrarea se publică în numărul de faţă al revistei.
2. I. Catrina, H. D. Schell, C. Iordache şi C. Niţu (Institutul de cercetări forestiere şi Institutul de biochimie): *Cercetări fiziologice şi biochimice în legătură cu fenomenul de uscare a stejarului.*
Lucrarea a fost publicată în nr. 1 din 1962 al revistei.
3. G. Haralambie (Institutul de cultură fizică):
Noi contribuţii în problema reacţiei Donaggio.

Trecînd pe scurt, în revistă, istoricul şi semnificaţia fiziopatologică a reacţiei, se relevă importanţa şi actualitatea ei în medicina sportivă ca mijloc de control al adaptării organismului la efort. Se amintesc principalii factori ce pot influenţa rezultatele, în parte sau total neglijaţi în diferite variante propuse pentru reacţie: prezenţa fosfaţilor în exces, prezenţa acidului ascorbic, comportarea coloranţilor, relaţia între „valoarea reacţiei" şi concentraţia substanţelor active etc. Observaţiile proprii se referă la crisoidină şi se arată că acest colorant nu prezintă metacromazie în sistemele de lucru, că prin diluarea acestora este respectată legea Lambert-Beer şi că relaţia extincţie-concentraţie de substanţe active în probe de tipul celei deja semnalate şi la alţi coloranţi (J. Heremans, 1957; G. Haralambie, 1961) prezintă 3 porţiuni liniare cu pante diferite, ceea ce face posibilă elaborarea eventuală a unui procedeu fotometric în reacţia Donaggio. În încheiere se discută unele rezultate obţinute cu metoda provizorie descrisă, la copii ce învaţă înotul.

ŞEDINŢELE CERCULUI DE BIOCHIMIE MEDICALĂ AL INSTITUTULUI DE BIOCHIMIE AL ACADEMIEI R.P.R. ŞI SOCIETĂŢII ŞTIINŢELOR MEDICALE — FILIALA BUCUREŞTI

În ziua de 9 noiembrie 1961 a avut loc, în amfiteatrul Spitalului Colţea, şedinţa prezidată de dr. Tr. Rădulescu, cu următoarea ordine de zi:

1. O. Costăchel, I. Kiţulescu şi N. Voiculeţ (Institutul oncologic): *Acţiunea acetilfosfatului şi acetilcolinei asupra colinesterazelor şi încorporării metioninei (^{35}S) în proteinele ficatului de şoarece.*

   Urmărind încorporarea aminoacizilor marcaţi (glicină, metionină) în proteine din omogenate de ţesuturi, autorii au constatat o acţiune activatoare a acetilfosfatului şi a acetilcolinei. De asemenea, au pus în evidenţă rolul colinesterazei în sinteza proteică care pare a fi legată de pH acid şi pare a fi esenţială în utilizarea energiei acetilfosfatului în procesul încorporării. Încorporarea metioninei — ^{35}S — în condiţiile experimentale folosite diferă de încorporarea glicinei — ^{14}C, prin faptul că glicina poate folosi acetilfosfatul ca activator al încorporării sale în proteine chiar dacă activitatea colinesterazei este inhibată.

2. S. M. Îdu şi L. Cociumian (Clinica medicală Colţea): *Aplicarea coloraţiei cu negru de Sudan la evaluarea cantitativă a lipidelor serice.*

   Pentru dozarea lipidelor, autorii aplică metoda colorimetrică cu negru de Sudan propusă de Swahn, preparînd colorantul după diferite variante propuse în literatură. În lipsa trioleinei s-a încercat folosirea uleiului de măsline şi uleiului de floarea-soarelui ca substanţă etalon. Fără să se adopte o tehnică fermă de preparare a colorantului, se arată că în condiţii riguros standardizate există o reproductibilitate foarte bună între datele obţinute cu ulei de măsline şi ulei de floarea-soarelui. Calculul statistic pe rezultatele a 20 determinări paralele, alături de metoda gravimetrică, nu a arătat diferenţe semnificative (testul Fischer 0,0147) între concentraţii de la 0—1300 mg/100 ml ser. Cercetarea va continua.

3. H. D. Schell (Institutul de biochimie): *Interacţiunea unor substanţe curarizante fluorescente cu proteinele serice.*

   Lucrarea a fost publicată în nr. 4 din 1961 al revistei.

4. C. Gurban şi E. Cristea (Catedra de biochimie I.M.F.): *Observaţii asupra citului de fosforilare în mitocondriile din ficatul de şobolan în sistemul oxidativ al succinatului.*

   Lucrarea a fost publicată în nr. 4 din 1961 al revistei.

În ziua de 11 ianuarie 1962, a avut loc în amfiteatrul Spitalului Colţea, şedinţa prezidată de acad. prof. E. Macovschi, cu următoarea ordine de zi:

1. I. Turcu (Spitalul de boli contagioase nr. 2): *Reactualizarea metabolismului bilirubinei şi consecinţele fiziopatologice* (referat).

   După o scurtă trecere în revistă a principalelor teorii privitoare la formarea bilirubinei, se insistă mai mult asupra bilirubingenezei reticulo-endoteliale, teorie unanim admisă astăzi. După descoperirea lui Ehrlich cu privire la diazoreacţia bilirubinei, Hymans van

den Bergh și colaboratori au meritul de a fi arătat comportarea diferită a serurilor icterice de etiologii diferite, față de reactivul diazo. Se descoperă deci, reacția directă și indirectă și se pune deschis problema existenței deosebirilor structurale între cele două bilirubine. Încercările de a explica această deosebire prin acceptarea legării bilirubinei indirecte de o proteină, prin sărurile biliare, catalizor hepatic etc. nu au decît un interes istoric. Cercetările făcute în 1953 și care sînt în continuare și astăzi, au reușit să arate — și lucrul a fost dovedit prin multiple demonstrații — că bilirubina indirectă este bilirubină pură în timp ce bilirubina directă este bilirubina conjugată cu una sau două molecule de acid glicuronic. Pentru conjugarea bilirubinei, sînt necesare acidul uridindifosfoglicuronic precursor — și transferaza, enzimă secretată de celulele hepatice. Rezultatele obținute de autorii acestor cercetări au avut consecințe practice. Într-adevăr, celor trei mari categorii de ictere : hemolitic, hepatitic și mecanic li se adaugă icterele metabolice cuprinzînd unele afecțiuni mai vechi ce-și găsesc acum o explicație patogenică, și alte afecțiuni mai noi. În cadrul icterelor metabolice se deosebesc pe de o parte, ictere prin deficit de transferază, iar pe de altă parte ictere prin deficit de eliminare a pigmentului. În cadrul icterelor prin deficit de transferază, deficitul poate fi tranzitoriu, ca în icterul fiziologic al noului născut, sau permanent ca în cholemia familială Gilbert sau icterul familial congenital al lui Crigler și Najjar. În cadrul icterelor prin deficit de eliminare, se descriu ictere în care tulburarea de eliminare se însoțește de depunerea pigmentului în celulele hepatice, ca în maladia Dubin-Johnson sau sindromul Sprinz-Nelson și ictere în care tulburarea de eliminare nu se însoțește de depunere de pigment în celulele hepatice, ca sindromul lui Rottov, Manahan, Florentin. Tulburarea de eliminare pare datorită unei modificări structurale a moleculei pigmentului printr-o eroare metabolică congenitală.

2. L. Ababei (Inst. fiziologie normală și patologică al Academiei R.P.R.) : *Oxidarea de substrate în reticulocite sub influența 2,4-dinitrofenolului* (lucrare executată la Institutul de chimie fiziologică al Universității Humboldt din Berlin — director prof. dr. S. Ropaport). Pentru studierea substratelor ce sînt oxidate în timpul respirației reticulocitelor, s-a folosit 2,4-dinitrofenolul care acționează prin desfacerea procesului de fosforilare oxidativă. În aceste condiții, s-a stabilit că substratul — aceasta însemnează donatorul de H^+ — reprezintă un factor limitant al lanțului respirator. În prezența 2,4-DNF se poate determina, la reticulocite, capacitatea maximă de oxidare a fiecărui substrat în parte. S-a putut demonstra astfel că la reticulocite glutamina, acizii glutamic, α-cetoglutaric, succinic, fumaric, malic, oxalacetic, citric, piruvic și lactic reprezintă substrate pentru respirația celulară. Capacitatea maximă de oxidare la reticulocite s-a stabilit a fi pentru oxalacetat. Cea mai mică capacitate de oxidare, pentru fumarat și malat ; glucoza inhibă respirația reticulocitelor, efect cunoscut sub numele de efect Krable și descris la celule canceroase, ascitice și leucocite. În prezența unui substrat din ciclul Krebs, glucoza prin furnizare de energie sub formă de ATP, stimulează respirația celulară, în special în prezența 2,4-DNF. Același efect îl au inozina și guanozina.

3. P. Ștefănescu, I. Hăulică și V. Nicolescu (Institutul de fiziologie normală și patologică al Academiei R.P.R.) : *Determinarea cromatografică în faza de vapori a unor amine în produsele biologice.*

4. S. Antohi și M. Antohi (Institutul „Dr. Cantacuzino") : *Dispozitiv de electroforeză microscopică pentru particule biologice în suspensie.*

Lucrarea a fost publicată în nr. 1 din 1962 al revistei.

În ziua de 27 februarie 1962, a avut loc la Societatea ştiinţelor medicale, şedinţa prezidată de prof. dr. I. Pavel, cu următoarea ordine de zi:

1. S. Cîmpeanu (Spitalul „Dr. Cantacuzino" — Serviciul nutriţie): *Aspecte biochimice ale arteriosclerozei.*

Referatul începe prin încercarea de a delimita anatomopatologic şi clinic arterioscleroza, după care se trece la prezentarea principalilor factori favorizanţi ai genezei arteriosclerozei. Primul factor favorizant analizat este biomorfoza organismului şi în special a ţesuturilor brahitrofe cu prezentarea modificărilor biochimice cunoscute pînă în prezent. Se trece apoi la analiza biomorfozei mediului circulant şi se face o primă sinteză comparativă cu arterioscleroza. Al doilea factor studiat este sexul, şi se încearcă să se definească biochimic cunoscuta predispoziţie a acestei afecţiuni degenerative pentru bărbaţi şi femei după climacterium. Se insistă asupra β-glucuronidazei, a cărei activitate în organism depinde de concentraţia oestrogenică şi în legătură cu aceasta, de posibilitatea intervenţiei 5-hidroxitriptaminei sau unui derivat al ei în arteriogeneză. Se trece apoi la analiza tulburărilor metabolismului lipidic, cel mai bine studiat pînă în prezent de către biochimie. Se ia în consideraţie rolul ce a fost atribuit trigliceridelor, colesterolului, acizilor graşi saturaţi şi nesaturaţi, fosfolipidelor sub forma lor circulantă de lipoproteide, precum şi sub forma lor fixă tisulară. Se arată că pînă în prezent, cu toate eforturile depuse, nu se poate atribui nici unuia din componenţii depozitului lipidic al organismului rolul de factor determinant în arterioscleroză. În partea finală a referatului se analizează modificările pe care le suferă mucopolizaharidele circulante şi mai ales cele din pereţii arteriali, care par să fie cronologic primele care intervin în geneza arteriosclerozei. Referatul se încheie cu încercarea unei sinteze a tuturor factorilor enumeraţi, sub forma unui cerc vicios metabolic, al cărui punct de plecare ar fi modificarea locală vasculară a tuturor vaselor din corp. Consecutiv ar surveni celelalte modificări de ordin metabolic, care ar avea darul de a accentua perturbarea locală vasculară, închizînd astfel cercul vicios.

2. S. M. Idu şi L. Cociumian (Clinica medicală Colţea): *Cercetări privind dozarea lipidelor serice.*

Deoarece dozarea lipidelor cu negru de Sudan ca o metodă comodă prezintă unele neajunsuri, asupra cărora autorii au insistat într-o comunicare anterioară, se prezintă rezultatele cercetărilor în scopul dozării turbidimetrice a lipidelor. Ca mediu de reacţie se alege amestecul alcool-cloroform, iar ca reactiv precipitant, acidul acetic 10%. Se stabilesc curbe de regresie extincţie-concentraţie pentru soluţii de ulei de măsline, floarea-soarelui, in, unt topit şi untură de porc, în care caz curbele nu arată o proporţionalitate directă. Se indică tehnica dozării lipidelor serice, unde curba extincţie-concentraţie evoluează liniar şi se arată că acizii oleic şi stearic, colesterolul şi lecitina nu precipită în condiţiile metodei.

MŰSZAKI KÖNYVTÁR

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI R.P.R.

BIOCHIMIE

ILIE VASILESCU **Enzimele**, 429 p., 22,80 lei.

CHIMIE

T. NĂȘCUȚIU, **Cromatografia pe hîrtie a substanțelor anorganice**, 320 p. + 3 pl., 13,90 lei.

G. A. RĂDULESCU, **Proprietățile țițeiurilor românești**, 357 p. + 9 pl., 19,90 lei.

J. REICHEL, **Tehnologia coloranților antrachinonici**, 440 p. + 3 pl., 21,50 lei.

Din

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

au apărut:

anul I, 1958, 4 n-re (a 5 lei);
anul II, 1959, 4 n-re (a 5 lei);
anul III, 1960, 4 n-re (a 5 lei);
anul IV, 1961, 4 n-re (a 5 lei);
anul V, 1962, 1 nr. (a 7 lei).

Numerele curente se găsesc de vînzare la

LIBRĂRIA ACADEMIEI R.P.R.

Bucureşti, Calea Victoriei nr. 27, sau la orice librărie ştiinţifică din ţară.

Se pot comanda şi prin poştă la secţia „Cartea prin poştă" de pe lîngă Librăria Academiei R.P.R., sau la librăria

„CARTEA PRIN POŞTĂ"

Bucureşti, str. Biserica Enei nr. 16, raionul 30 Decembrie.

Abonamentele se fac la oficiile poştale, prin factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Pentru străinătate, cererile de numere izolate sau de abonamente se fac prin întreprinderea de stat pentru comerţul exterior „Cartimex" I.S.C.E., str. Aristide Briand nr. 14, sau căsuţa poştală 134—135, Bucureşti.

I. P. C. c. 1652

Lei 7.—

F 1330

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

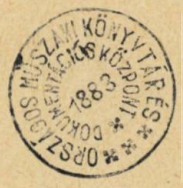
3
ANUL V
1962

studii şi cercetări de biochimie

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE



3

ANUL V

1962

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

COMITETUL DE REDACȚIE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI, *redactor responsabil*; ACADEMICIAN R. VLĂDESCU; D. ISĂCESCU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; S. OERIU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; E. SORU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; M. MEZINCESCU; H. SLUȘANSCHI, *redactor adjunct*; I. VASILESCU; V. ALEXANDRESCU, *secretar tehnic de redacție*.

REVISTA STUDII ȘI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

APARE DE 4 ORI PE AN

Redacția: BUCUREȘTI, Str. Popovici nr. 20
Telefon 18.43.55 — 17.79.63.

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul V, nr. 3 1962

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, I. STEOPOE şi S. CEAUŞESCU, Cercetarea structurii coacervatelor prin metoda citologică 323

S. OERIU, I. TĂNASE şi V. DINU, Studiul aminoacidemiei în tuberculoza experimentală la cobai 331

S. OERIU, G. COSTESCU, O. TEODORESCU şi I. ŞOIMU, Studiul activităţii cocarboxilazei, transaminazei şi al capacităţii de transacetilare în procesele de îmbătrînire 337

S. OERIU, M. TIGHECIU-DUMITRESCU şi L. ENACHE-PEREDERI, Studiul activităţii unor enzime de oxido-reducere în procesele de îmbătrînire 343

S. OERIU, G. GRIGORESCU şi M. MĂNESCU, Dinamica fosforului lipidic în funcţie de vîrsta animalului şi sub acţiunea unor substanţe proprii organismului 347

C. BODEA şi T. LÁSZLÓ, Cercetări asupra caracterelor biochimice speciale ale porumbului. II. Despre potenţialul redox al boabelor de porumb . . 351

C. BODEA şi V. TĂMAŞ, Transformarea zeaxantinei în eschscholtzxantină şi mutatoxantină sub acţiunea tetraacetatului de plumb 359

L. M. BURUIANĂ şi V. PAVLU, Efectul radiaţiilor asupra proteinelor. VI. Influenţa radiaţiilor γ asupra proteinelor din cristalin 365

L. M. BURUIANĂ şi EL. HADARAG, Modificări adaptive ale fosfomonoesterazei eritrocitare în cursul evoluţiei filogenetice 377

I. VASILESCU şi G. BOLTAŞU, Producerea riboflavinei prin biosinteză . . . 383

VICTORIA ALEXANDRESCU, Localizarea activităţii amilazei şi invertazei pe fracţiunile proteice solubile din seminţele de porumb în timpul încolţirii . 399

VICTOR GHEŢIE şi DAN MOŢET-GRIGORAŞ, Electroforeza şi imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză 409

C. GURBAN şi ELENA CRISTEA, Influenţa decuplanţilor, a inhibitorilor transportului de electroni şi a concentraţiei substratului asupra cîtului de fosforilare cu succinat 415

C. GURBAN şi ELENA CRISTEA, Influenţa timpului de incubare asupra valorii cîtului de fosforilare cu succinat 423

I. F. DUMITRU, Biochimia creierului. I. Separarea fosfolipidelor din creier pe coloană de silicagel. Determinarea vitezei de refacere a diferiţilor componenţi fosfolipidici, folosind izotopi radioactivi (^{14}C) 435

Pag

M. FURNICĂ și M. SPIRIDON, Viteza de peroxidare a omogenatelor de țesuturi la iradierea *in vitro* 447

NOTĂ DE LABORATOR

D. ONEȘANU, O metodă fotometrică pentru dozarea 11α-hidroxiprogesteronei din medii fermentate 453

RECENZII 457

CRONICA BIOCHIMIEI DIN R.P.R. 475

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

АКАДЕМИЯ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

ТРУДЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ ПО БИОХИМИИ

Том V, № 3 1962

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

Е. МАКОВСКИ, И. СТЕОПОЕ и С. ЧАУШЕСКУ, Исследование строения коацерватов цитологическим методом 323

С. ОЕРИУ, И. ТЭНАСЕ и В. ДИНУ, Исследование содержания аминокислот при экспериментальном туберкулезе у морских свинок 331

С. ОЕРИУ, Г. КОСТЕСКУ, О. ТЕОДОРЕСКУ и И. ШОЙМУ, Исследование активности кокарбоксилазы, трансаминазы и способности трансацетилирования в процессах старения 337

С. ОЕРИУ, М. ТИГЕЧИУ-ДУМИТРЕСКУ и Л. ЕНАКЕ-ПЕРЕДЕРИ, Исследование активности некоторых окислительно-восстановительных энзимов в процессах старения 343

С. ОЕРИУ, Г. ГРИГОРЕСКУ и М. МЭНЕСКУ, Динамика липидного фосфора в зависимости от возраста животного и влияния некоторых свойственных организму веществ 347

К. БОДЯ и Т. ЛАСЛО, Исследования специальных биохимических характеристик кукурузы. II. О редокс-потенциале зерен кукурузы . . . 351

К. БОДЯ и В. ТЭМАШ, Превращение зеаксантина в эшшольцксантин и мутатоксантин под влиянием тетрацетата свинца 359

Л. М. БУРУЯНЭ и В. ПАВЛУ, Влияние излучений на белки. VI. Влияние γ-лучей на белки хрусталика 365

Л. М. БУРУЯНЭ и ЕЛ. ХАДАРАГ, Адаптивные изменения эритроцитной фосфомоноэстеразы во время филогенетической эволюции 377

И. ВАСИЛЕСКУ и Г. БОЛТАШУ, Получение рибофлавина в процессе биосинтеза 383

ВИКТОРИЯ АЛЕКСАНДРЕСКУ, Локализация активности амилазы и инвертазы в растворимых белковых фракциях семян кукурузы во время прорастания 399

ВИКТОР ГЕЦИЕ и ДАН МОЦЕТ-ГРИГОРАШ, Электрофорез и иммунодиффузия белков в геле агарозы 409

К. ГУРБАН и ЕЛЕНА КРИСТЯ, Влияние декуплирующих веществ, ингибиторов переноса электронов и концентрации субстрата на результат фосфорелирования в присутствии сукцината 415

К. ГУРБАН и ЕЛЕНА КРИСТЯ, Влияние, оказываемое продолжительностью инкубации на значение отношения фосфорелирования в присутствии сукцината 423

И. Ф. ДУМИТРУ, Биохимия мозга. I. Разделение фосфолипидов мозга на колонке силикагеля. Определение скорости обновления различных фосфолипидных компонентов при помощи радиоактивных изотопов (^{14}C) 435

Стр.

М. ФУРНИКЭ и М. СПИРИДОН, Скорость окисления с образованием пероксидов гомогенатов тканей при облучении in vitro 447

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Д. ОНЕШАНУ, Фотометрический метод определения 11α-гидроксипрогестерона в подвергнутых брожению средах 453

РЕЦЕНЗИИ 457

ХРОНИКА БИОХИМИИ В РНР 475

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ

ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOCHIMIE

ÉTUDES ET RECHERCHES DE BIOCHIMIE

Tome V, n° 3 1962

SOMMAIRE

Page

E. MACOVSCHI, I. STEOPOE et S. CEAUŞESCU, Étude de la structure des coacervats par la méthode cytologique 323

S. OERIU, I. TĂNASE et V. DINU, Étude de l'aminoacidémie dans la tuberculose expérimentale du cobaye 331

S. OERIU, G. COSTESCU, O. TEODORESCU et I. ŞOIMU, Activité de la co-carboxylase et de la transaminase et capacité de transacétylation dans les processus de vieillissement 337

S. OERIU, M. TIGHECIU-DUMITRESCU et L. ENACHE-PEREDERI, Activité de certaines enzymes d'oxydo-réduction dans les processus de vieillissement 343

S. OERIU, G. GRIGORESCU et M. MĂNESCU, Dynamique du phosphore lipidique en fonction de l'âge de l'animal et sous l'action de certaines substances propres à l'organisme 347

C. BODEA et T. LÁSZLÓ, Recherches sur les caractères biochimiques spéciaux du maïs. II. Le potentiel rédox des graines de maïs 351

C. BODEA et V. TĂMAŞ, Transformation de la zéaxanthine en eschscholtzxanthine et mutato-xanthine par l'action du tétraacétate de plomb . . 359

L. M. BURUIANĂ et V. PAVLU, Effet des radiations sur les protéines. VI. Influence des rayons γ sur les protéines du cristallin 365

L. M. BURUIANĂ et EL. HADARAG, Modifications adaptatives de la phosphomonoestérase érythrocytaire au cours de l'évolution phylogénétique . . 377

I. VASILESCU et G. BOLTAŞU, Production biosynthétique de la riboflavine 383

VICTORIA ALEXANDRESCU, Localisation de l'activité de l'amylase et de l'invertase sur les fractions protéiques solubles des graines de maïs pendant la germination 399

VICTOR GHEŢIE et DAN MOŢET-GRIGORAŞ, L'électrophorèse et l'immunodiffusion des protéines dans le gel d'agarose 409

C. GURBAN et ELENA CRISTEA, Influence des découplants, des inhibiteurs du transport d'électrons et de la concentration du substratum sur le quotient de la phosphorylation au succinate 415

C. GURBAN et ELENA CRISTEA, Influence de la durée d'incubation sur la valeur du rapport de phosphorylation au succinate 423

I. F. DUMITRU, Brain Biochemistry. I. Severing of phospholipids of the brain in silicagel column. Determination of recovering speed in phospholipid compounds by means of radioactive isotopes (^{14}C) 435

Page

M. FURNICĂ et M. SPIRIDON, La vitesse de péroxydation des tissus homogénéisés lors de leur irradiation *in vitro* 447

NOTE DE LABORATOIRE

D. ONEŞANU, Une méthode photométrique pour le dosage de l'11 α-hydroxyprogestérone des milieux fermentés 453

COMPTES RENDUS 457

CHRONIQUE DE LA BIOCHIMIE DANS LA R. P. ROUMAINE 475

ÉDITIONS DE L'ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE

CERCETAREA STRUCTURII COACERVATELOR PRIN METODA CITOLOGICĂ

DE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI, I. STEOPOE şi S. CEAUŞESCU

Numeroasele cercetări au scos în evidenţă importanţa deosebită a coacervatelor pentru diferitele domenii ale ştiinţei. Astfel, studiul coacervatelor formează obiectul unui capitol special al coloidologiei, coacervatele reprezentînd o stare coloidală a materiei deosebită de aceea a unui sol sau a unui gel, ceea ce se subliniază în diferite tratate de specialitate, ca cele publicate de J. W. Mc Bain [1], H. R. Kruyt [2], S. M. Lipatov [3] şi alţii. Totodată, coacervatele prezintă interes şi pentru biologie, deoarece multe din însuşirile lor fizico-chimice se aseamănă atît de mult cu însuşirile fizico-chimice ale citoplasmei, încît specialişti ca H. G. Bungenberg de Jong [4], P. Danjar [5], J. Duclaux [6], T. N. Evreinova [7], A. Guilliermond [8], P. V. Makarov [9], A. I. Oparin [10], A. S. Troşin [11] şi alţii, consideră citoplasma ca fiind materie în stare de coacervat. În fine, coacervatele sînt importante şi din punct de vedere al problemei originei vieţii pe pămînt, reprezentînd — după A. I. Oparin [12] — acea formă evolutivă a materiei nevii, care a generat viaţa.

Printre însuşirile coacervatelor, cea care a atras în mod deosebit atenţia unor cercetători ca H. G. Bungenberg de Jong [13], [14], [15], A. I. Oparin [10] şi altora, este însuşirea de a forma spontan diferite membrane, vacuole şi structuri interne care se pot prezenta sub forme variate, mai mult sau mai puţin labile.

Structurile din interiorul coacervatelor au fost cercetate pînă acum prin observarea directă la microscop a picăturilor de coacervat, ceea ce reprezintă evident numai o primă etapă a investigaţiilor în acest domeniu. Pentru cercetări mai aprofundate trebuia însă realizată secţionarea picăturilor de coacervat, căci numai în felul acesta s-ar putea ajunge la observarea structurilor în condiţii mai bune. De aceea, avînd în vedere asemănarea profundă dintre însuşirile fizico-chimice ale citoplasmei pe de o

parte și ale coacervatelor proteice pe de altă parte, semnalată de diferiți autori menționați [4]—[11], ne-am hotărît să aplicăm pentru cercetarea structurii interne a coacervatelor ce conțin proteine, metode citologice utilizate curent pentru studiul structurii celulelor.

Ca obiect de cercetare am ales picăturile de coacervat care se formează prin tratarea serului sangvin uman cu gumă arabică în prezența unei cantități mici de acid acetic [16]. Conform investigațiilor noastre anterioare, coacervatul acesta este destul de stabil, se prezintă sub formă de picături relativ mari și rezistente care, observate la microscop, par să cuprindă vacuole de dimensiuni diferite. Picăturile acestui coacervat ni s-au părut deosebit de potrivite pentru atingerea scopului urmărit, fiindcă la formarea lor participă proteine native din serul sangvin, ceea ce face ca coacervatul respectiv să fie mai apropiat ca însușiri de citoplasmă decît coacervatele ce se obțin din gelatină sau alte substanțe proteice mai mult sau mai puțin purificate ; apoi — fiindcă în momentul formării, picăturile acestui coacervat includ în ele aproape toată cantitatea de colesterol din ser [17], care poate contribui nu numai la apariția, dar și la stabilizarea structurilor interne din picăturile acestui coacervat ; în fine — fiindcă prepararea coacervatului amintit, în prezența diferitelor emulsii, ca de exemplu a emulsiilor de untdelemn în apă, face ca picăturile materialului emulsionat să se includă cu ușurință în picăturile coacervatului, formînd acolo incluziuni grase, ceea ce ne-ar permite să stabilim dacă astfel de formații pot fi fixate, secționate și cercetate în aceleași condiții ca celulele cu incluziuni lipidice ale oricărui țesut.

Deși este destul de stabil, coacervatul format prin tratarea serului sangvin cu gumă arabică și acid acetic s-a dovedit a fi totuși sensibil față de diferiți fixatori folosiți curent în tehnica histo- și citologică. Astfel, adaosul de formol, lichid Duboscq-Brazil, „Susa", Zenker [18], sau de alți fixatori la mediul în care s-a format în prealabil coacervatul, face ca picăturile acestuia să devină tot mai mici și să dispară. De aceea, înainte de introducerea fixatorilor, se impunea stabilizarea picăturilor de coacervat, ceea ce ne-a reușit prin aplicarea procedeului cu zaharoză elaborat de A. Claude [19] și de G. H. Hogeboom, W. C. Schneider și G. E. Palade [20], pentru stabilizarea mitocondriilor și a altor formații corpusculare intracelulare în vederea separării lor din omogenate tisulare. În același scop am ținut seamă și de cercetările lui A. S. Trošin [21] conform cărora picăturile coacervatului format din gelatină și gumă arabică se pot păstra timp îndelungat dacă lichidul de echilibru conține, de exemplu, zaharoză. Adăugînd deci zaharoza la suspensia picăturilor coacervatului nostru în lichidul de echilibru, am constatat că în prezența zaharozei picăturile coacervatului menționat devin rezistente la acțiunea distrugătoare amintită a fixatorilor și pot fi fixate cu ușurință de către aceștia din urmă. Fixatorul care ne-a dat rezultatele cele mai bune a fost soluția de tetraoxid de osmiu 2%.

După fixare și spălare repetată la centrifugă cu soluția de zaharoză, picăturile de coacervat se comportă ca niște bile minuscule, elastice și stabile, care în soluția de zaharoză pot fi păstrate timp îndelungat.

Cercetate la microscop, aceste bile se prezintă sub aspecte diferite, în funcție de concentrația soluției de zaharoză. În soluții concentrate, picăturile de coacervat fixate se strîng și capătă un aspect neregulat, prezentînd în interior o mulțime de incluziuni care arată neomogenitatea materialului din care sînt alcătuite, iar în soluții diluate, precum și în apă distilată, se umflă și capătă aspectul asemănător cu acela al unor celule sferice cu o singură vacuolă centrală mare, plină de lichid omogen. Această comportare arată că materialul din care este alcătuit coacervatul este mult mai permeabil pentru apă decît pentru zaharoză, fenomenele observate fiind asemănătoare cu cele de plasmoliză.

Odată fixate și spălate cu soluție de zaharoză, picăturile de coacervat urmau să fie incluse într-un material potrivit care să permită apoi secționarea lor la microtom. Ținînd seama că picăturile de coacervat se aseamănă ca dimensiuni cu unele protiste, am recurs pentru includerea și secționarea picăturilor de coacervat, la tehnica imaginată de E. Chatton [22], [23] pentru includerea și secționarea protistelor. Procedînd conform acestei tehnici, am adăugat o soluție de agar-agar sau geloză la sedimentul centrifugatului care conține picăturile fixate de coacervat și am răcit repede amestecul final. În aceste condiții, soluția de agar-agar se întărește și astfel se pot tăia blocușoare care se tratează ca orice piesă citologică, și anume : se realizează deshidratarea progresivă cu alcool de concentrații crescînde, se îndepărtează alcoolul prin benzol, și în fine, se procedează la impregnare cu parafină ; apoi se secționează la microtom, iar secțiunile se lipesc pe lamă cu albumină-glicerină (Mayer). După deparafinare cu xilol și montare în balsam de Canada sau ulei de cedru, secțiunile pot fi cercetate la microscop.

Tehnica de obținere și prelucrare a picăturilor de coacervat :

La 1 ml ser sangvin se adaugă 1 ml soluție gumă arabică 1%, 0,6 ml acid acetic 20% și 7,4 ml soluție de zaharoză 50%. Se formează o soluție tulbure care, examinată la microscop, arată prezența numeroaselor picături de coacervat de dimensiuni diferite.

Pentru fixarea coacervatului obținut se adaugă la cei 10 ml de suspensie, 1 ml de fixator ca : formol 40%, Duboscq-Brasil, Susa, Zenker, tetraoxid de osmiu 2% etc. Fixarea durează 24—48 de ore, timp în care picăturile de coacervat se depun la fundul vasului. După eliminarea supernatantului, se adaugă la sediment 10 ml soluție de zaharoză 50% și se centrifughează la 1000 rot/min, timp de 5 min. Această spălare cu soluție de zaharoză 50% se repetă de 3—4 ori. La sedimentul astfel obținut, care conține picăturile fixate de coacervat, se adaugă o soluție caldă de agar-agar 2% (sau geloză) și se răcește brusc la 3—4°. După solidificare, materialul se scoate din eprubetă și se taie în blocușoare, cu latura de 3—5 mm. Blocușoarele astfel obținute sînt deshidratate ca orice piesă citologică, trecîndu-le succesiv timp de cîte o oră în alcool etilic de 70, 80, 96 și 100°, schimbîndu-se fiecare alcool de cîteva ori. Apoi, blocușoarele se introduc pentru 2 ore în benzol, schimbîndu-se acesta din urmă de 2—3 ori. În fine, se impregnează cu parafină timp de 3—4 ore la temperatura de 59°C. Din piesele incluse în parafină se fac secțiuni de 4—6 μ grosime și se lipesc pe lamă cu albumină-glicerină Mayer. După uscare, secțiunile sînt deparafinate cu xilol și montate în balsam de Canada sau ulei de cedru. Astfel obținute, secțiunile picăturilor de coacervat pot fi observate la microscop în condiții favorabile pentru imersie.

Dat fiind că picăturile de coacervat obținut prin tratarea serului sangvin cu guma arabică și acid acetic au un diametru pînă la 30 μ și

chiar mai mult, şi ţinînd seama că microtomul obişnuit permite obţinerea comodă a secţiunilor de 4 — 6 μ grosime, rezultă că o picătură fixată de coacervat poate fi secţionată fără dificultăţi în 3 — 8 felii, după caz.

Microfotografia unei secţiuni printr-o picătură de coacervat este redată în figura 1. Se observă că la exterior picătura prezintă o peliculă fină, comparabilă ca aspect morfologic cu o membrană celulară. Conţinutul picăturii este format dintr-o matrice omogenă de culoare slab galbenă, caracteristică materialului citoplasmatic fixat cu tetraoxid de osmiu. În interiorul acestei matrice, care este mai evidentă la periferia picăturii, se observă incluziuni vacuolare de diferite mărimi, cu contur circular, ovoid sau alungite. Incluziunile vacuolare de talie mai mare sînt aşezate în centrul picăturii. Aceste incluziuni vacuolare au un conţinut incolor, care devine refringent la vacuolele de talie mai mică atunci cînd se coboară condensatorul microscopului. Printre aceste vacuole, tot în interiorul matricei galben-palide, se observă numeroase granulaţii de talie foarte mică, la limita vizibilităţii obiectivului cu imersie Zeiss 60 × şi ocularul Zeiss 10 ×.

În figura 2 se prezintă trei secţiuni succesive (a, b şi c) efectuate prin aceleaşi picături de coacervate.

În fine, am aplicat aceeaşi tehnică de cercetare la picăturile de coacervat în care au fost incluse, sub formă de vacuole, mici picături de ulei vegetal.

Obţinerea coacervatului cu incluziuni de ulei:

La 1 ml ser sangvin se adaugă 1 ml soluţie gumă arabică 1%, 0,6 ml acid acetic 20%, 7,4 ml soluţie zaharoză 50% şi 2 picături de ulei de floarea-soarelui. După agitare puternică, se constată la microscop, că picăturile de coacervat conţin incluse în ele mici picături de ulei. Această includere a uleiului în picăturile de coacervat se observă şi mai bine dacă uleiului i se adaugă în prealabil puţin roşu Sudan. Odată obţinut coacervatul cu incluziuni de ulei, se adaugă la lichidul în care se află acest coacervat 1 ml fixator (soluţie apoasă de tetraoxid de osmiu 2%) şi se procedează ca mai înainte.

Din figura 3 se vede că forma şi structura picăturilor de coacervat obţinute în prezenţa uleiului vegetal se deosebesc de cele ale picăturilor de coacervat obţinute fără adaos de ulei: forma în general este neregulată, iar matricea coacervatului de culoare galben palidă este mai omogenă, deoarece cantitatea incluziunilor din interiorul ei este mai redusă. În interiorul materiei coacervatului se observă una sau mai multe incluziuni de lipid, de diferite mărimi, la nivelul cărora s-a redus tetraoxidul de osmiu, colorîndu-le în negru. În unele picături de coacervat se mai observă o vacuolă mai mare, centrală, iar la altele mai multe vacuole mici. În jurul picăturilor de lipid sînt prezente mici granulaţii, la limita vizibilităţii microscopului optic.

Astfel, stabilizînd cu zaharoză picăturile coacervatului ce se obţin prin tratarea serului sangvin uman cu gumă arabică şi acid acetic, şi fixînd aceste picături cu diferiţi fixatori folosiţi curent în tehnica histo- şi citologică, în special cu tetraoxidul de osmiu, se poate obţine un material stabil, prelucrabil prin metode citologice în vederea secţionării

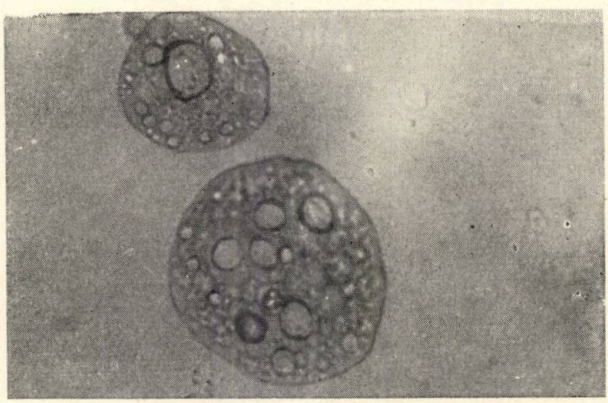
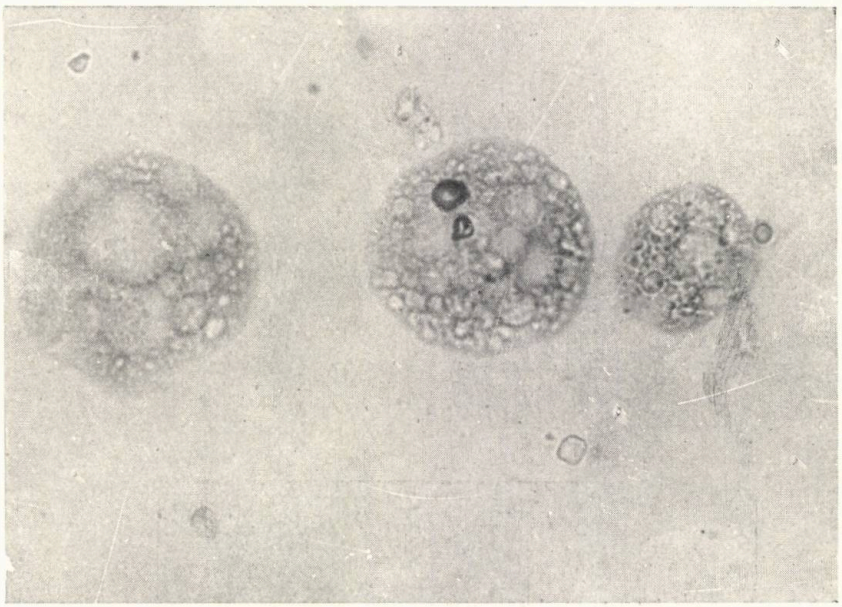
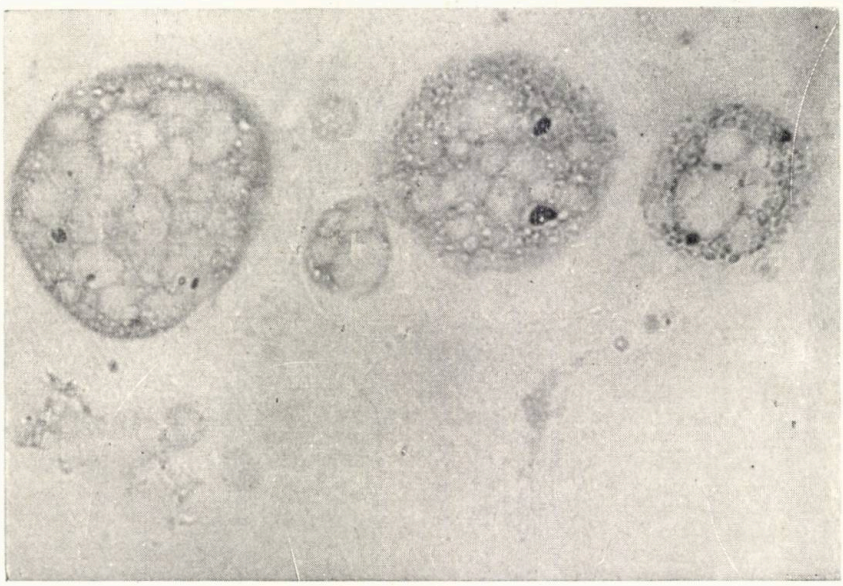


Fig. 1. — Secțiuni (6 μ grosime) prin două picături de coacervat obținut prin tratarea serului sangvin uman cu gumă arabică și acid acetic.

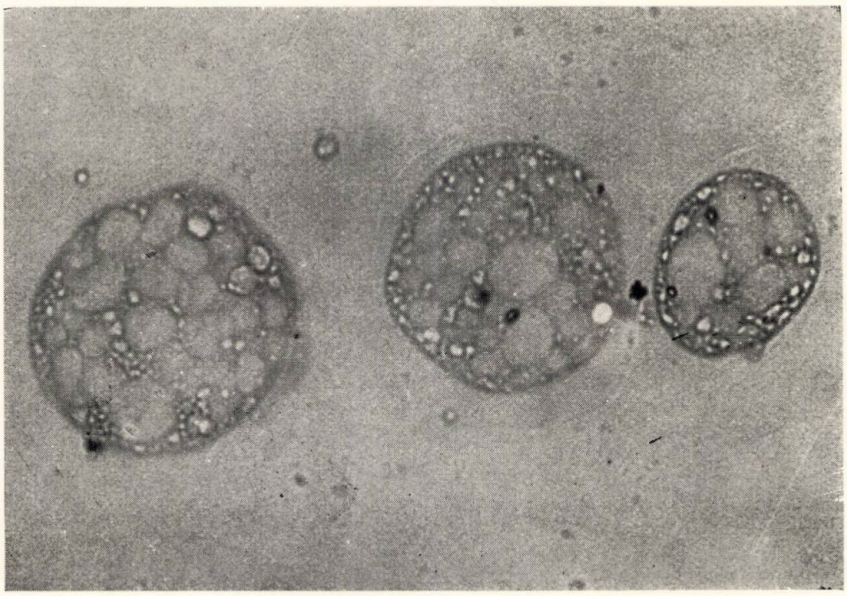


a



b

Fig. 2 *a*, *b*. — Secțiuni succesive (5 μ grosime) prin picăturile de coacervat obținut prin tratarea serului sangvin uman cu gumă arabică și acid acetic.



c

Fig. 2 *c*. — Secțiuni succesive (5 μ grosime) prin picăturile de coacervat obținut prin tratarea serului sangvin uman cu gumă arabică și acid acetic.

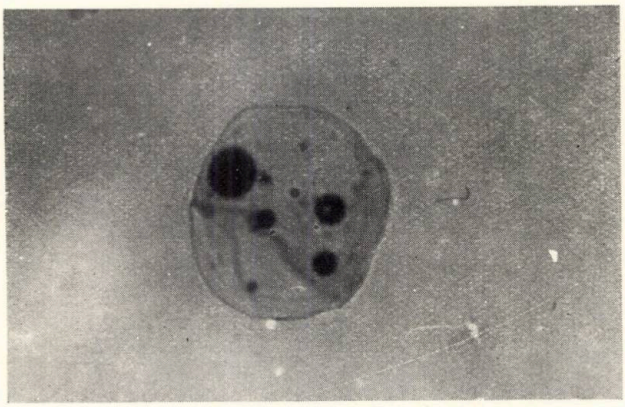


Fig. 3. — Secțiune (5 μ grosime) printr-o picătură de coacervat ce conține incluziuni de ulei vegetal.

la microtom. Secţiunile realizate în felul acesta arată prezenţa anumitor structuri interne şi pot fi cercetate la microscop în aceleaşi condiţii ca şi citoplasma oricăror celule. Cercetarea mai detaliată a acestor structuri şi colorarea secţiunilor de coacervat, vor forma obiectul unei alte lucrări.

Prezentată la redacţie la 19 aprilie 1962
Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.
şi
Catedrele de anatomie-histologie-embriologie
şi de biochimie ale Universităţii
din Bucureşti

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРОЕНИЯ КОАЦЕРВАТОВ ЦИТОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

РЕЗЮМЕ

Для исследования под микроскопом строения капель коацервата авторы применяли цитологический метод. Принимая во внимание, что фиксаторы легко разрушают капли коацервата до фиксажа, их стабилизировали добавлением сахарозы, а для введения и секционирования прибегли к технике Р. Шаттона, примененной им в случае протистов. Работа проводилась на коацерватах, полученных обработкой кровяной сыворотки гумми-арабиком и уксусной кислотой.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Разрезы (толщина 6 μ) двух капель коацервата, полученного обработкой человеческой кровяной сыворотки гумми-арабиком и уксусной кислотой.

Рис. 2. — (a, b, c). Последовательные разрезы (толщина 5 μ) капель коацервата, полученного обработкой человеческой кровяной сыворотки гумми-арабиком и уксусной кислотой.

Рис. 3. — Разрез (толщина 5 μ) капли коацервата, содержащего включения растительного масла.

ÉTUDE DE LA STRUCTURE DES COACERVATS PAR LA MÉTHODE CYTOLOGIQUE

RÉSUMÉ

Dans l'étude microscopique de la structure des gouttes de coacervat les auteurs ont appliqué la méthode cytologique. Étant donné que les fixateurs détruisent facilement les gouttes de coacervat avant de les fixer,

ils ont eu recours à la stabilisation de ces gouttes par l'addition de saccharose, et pour l'inclusion et le sectionnement, à la technique employée par R. Chatton dans le cas des protistes. L'étude a porté sur des coacervats obtenus à partir du sérum sanguin par traitement à la gomme arabique et à l'acide acétique.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Coupes (de 6 μ d'épaisseur) à travers deux gouttes de coacervat obtenu par traitement du sérum sanguin humain à la gomme arabique et à l'acide acétique.

Fig. 2. — (*a*, *b*, *c*) — Coupes successives (de 5 μ d'épaisseur) à travers des gouttes de coacervat obtenu par traitement du sérum sanguin humain à la gomme arabique et à l'acide acétique.

Fig. 3. — Coupe (de 5 μ d'épaisseur) à travers une goutte de coacervat contenant des inclusions d'huile végétale.

BIBLIOGRAFIE

1. J. W. Mc Bain, *Colloid Science*, Edit. Heath, Boston, 1950, 184—187.
2. H. R. Kruyt, *Colloid Science*, Edit. Elsevier, London, Amsterdam, New York, 1951, II, cap. X, 338—372.
3. С. М. Липатов, *Физикохимия коллоидов*. Госхимиздат, Москва, 1948, 208—215.
4. H. G. Bungenberg de Jong, *Die Koazervation und ihre Bedeutung für die Biologie*, Protoplasma, **15**, 110—173 (1931).
5. П. Данжар, *Цитология растений и общая цитология*, Москва, 1950, 1—652.
6. J. Duclaux, *Leçons de chimie physique appliquée à la biologie. III. Rigidité, thixotropie, coacervation*, Actualités scientifiques, Herman édit., Paris, **127**, *3*, 1—43 (1934).
7. Т. Н. Евреинова, *Коацерваты*, Усп. совр. биол., **37**, *2*, 177—202 (1954).
8. A. Guilliermond, *The cytoplasm of the plant cell*, Publ. by Chron. Botan. Co Waltham, Mass, 1—248 (1941).
9. П. В. Макаров, *Физикохимические свойства клетки и методы их изучения*, Ленинград, 1948, 1—324.
10. Л. И. Опарин, *Возникновение жизни на земле*, Изд. АН СССР, Москва, стр. 287—297.
11. А. С. Трошин, *Проблема клеточной проницаемости*, Изд. АН СССР, Москва-Ленинград, 1956, 52—73.
12. A. I. Oparin, *Originea vieţii pe pământ*. Edit. ştiinţifică, Bucureşti, 1960, 292—333.
13. H. G. Bungenberg de Jong, H. Sengers, *Complex relationship in lyophilic colloidal systems. II. Complex and autocomplex gels*. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, *53*, 171—185 (1934).
14. H. G. Bungenberg de Jong, O. Bank, E. Hoskam, *Morphologische Studien an Komplexkoazervaten. Flussige bzw. gelatinierte Schaum- und Hohlkörper*, Protoplasma **34**, 30—54 (1940).
15. H. G. Bungenberg de Jong, *Distribution of the complex component which is present in exces, between complexcoacervate and equilibrium liquid*, Proc. Royal Akad. Amsterdam, **50**, 707—711 (1947).
16. E. Macovschi, M. Cărsteanu, *Coacervatul dintre proteinele serului sangvin uman şi guma arabică*, Studii şi cercet. biochimie, **2**, 111—117 (1959).
17. E. C. Bleoancă, *Starea de coacervat a protoplasmei*, Lucrare de diplomă pentru examenul de Stat. Univ. Bucureşti, 1958, 67—70.

18. B. ROMEIS, *Taschenbuch der mikroskopischen Technik*, Verlag R. Oldenburg, München-Berlin, 1943.
19. A. CLAUDE, *Harvey Lectures*, Springfield, 1947.
20. G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER, G. E. PALADE, *Cytochemical studies of tissues*. J. biol. chem., **172**, 619 (1948).
21. А. С. ТРОШИН, *Распределение веществ между клеткой и средой. Сообщ. 1. Распределение галактозы и сахара в комплексных коацерватных системах (модельные опыты)*. Бюл. эксп. биол. и мед., **31**, 3, 180—185 (1954).
22. E. CHATTON, *Microinclusion a l'agar-paraffine, technique protistologique et embryologique*. Bull. d'Hist. Appl., **IV**, 1—9 (1927).
23. E. CHATTON, *Utilisation de la gélose pour la préparation in toto d'éléments microscopiques en suspension dans les milieux non coagulables*. Bull. d'Hist. Appl., **VI**, 268—270 (1929).

STUDIUL AMINOACIDEMIEI ÎN TUBERCULOZA EXPERIMENTALĂ LA COBAI

DE

S. OERIU

MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R.P.R.

I. TĂNASE și V. DINU

Stabilirea unor teste biochimice privind evoluția tuberculozei experimentale și umane este de o importanță deosebită în aplicarea unui tratament corespunzător.

Datele bibliografice indică o legătură între raportul unor aminoacizi și evoluția tuberculozei experimentale [1].

În lucrarea de față ne-am propus studiul aminoacizilor liberi și polipeptidici și al aminoacizilor totali din serul provenit de la animale (cobai) martore, de la animale infectate cu *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Rv$ și de la animale infectate în aceleași condiții și supuse tratamentului cu streptomicină.

MATERIAL ȘI METODE DE LUCRU

Experiența s-a făcut pe un număr de 60 de animale (cobai), împărțite în 3 loturi a cîte 20 de animale martore, animale infectate și animale infectate și tratate cu streptomicină.

Animalele de experiență au fost ținute în aceleași condiții de alimentație și cazare. Animalele infectate au primit subcutan o doză de 1/1000 mg *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Rv$, cultură de 21 de zile, crescută pe mediu solid Löwenstein.

După 14 zile de la infectare, s-a administrat zilnic, timp de 3 luni, cîte o doză de streptomicină de 32 mg/kg corp.

După 90 de zile de la încetarea tratamentului animalele au fost sacrificate prin puncție cardiacă. Sîngele astfel obținut se păstrează 24 de ore la temperatura camerei, se decantează serul, care apoi se centrifughează pentru a se îndepărta ultimele urme de hematii.

Determinarea aminoacizilor liberi + polipeptidici. La 4 ml ser proaspăt obţinut se adaugă 10 ml acetonă clorhidrică (100 ml acetonă + 2 ml HCl concentrat), după care se păstrează o oră la temperatura camerei şi apoi se centrifughează.

Se decantează supernatantul într-o capsulă de evaporare.

Precipitatul format se reia de 2 ori cu acetonă clorhidrică (în total 20 ml), amestecîndu-se bine cu o baghetă, după care se centrifughează. Se unesc cele 3 supernatante în aceeaşi capsulă de evaporare. Se evaporă la sicitate pe baie de apă. Se reia reziduul cu 1 ml NH_4OH 0,5 N şi se adaugă 4 ml H_2O + 1 ml eter etilic. Se lasă 30 min la temperatura camerei. Stratul eteric se separă prin decantare, iar soluţia apoasă se evaporă la sicitate. Reziduul se reia cu 5 ml HCl 20% şi se supune unei autoclavări, timp de 2 ore, la 3 atmosfere presiune. Se evaporă apoi la sicitate şi se reia cu 2 ml NH_4OH 0,5 N. Din acest reziduu se folosesc 0,04 ml pentru separarea aminoacizilor dicarboxilici, cistinei şi treoninei iar 0,08 ml pentru ceilalţi aminoacizi.

Separarea şi dozarea aminoacizilor liberi se face după indicaţiile lui Racinski [2], Savoia [3] şi Barrollier [4], prin cromatografie pe hîrtie în developare descendentă *) şi radială **), cu modificările introduse în prelucrarea materialului biologic, alegerea sistemului de dizolvanţi şi condiţiile de developare [5].

Determinarea aminoacizilor totali din ser. La 1 ml ser proaspăt obţinut se adaugă 5 ml HCl 20% şi se autoclavează timp de 3 ore, la 2 atmosfere presiune. Hidrolizatul astfel obţinut se aduce la un volum de 10 ml, din care se ia 1 ml care se usucă apoi la sicitate; rezidiul se reia cu 1 ml NH_4OH 0,5 N.

Se pun apoi probe de 0,02 ml pentru separarea aminoacizilor prin cromatografie descendentă şi de 0,004 ml pentru cromatografie radială, după indicaţiile folosite la separarea acizilor aminaţi liberi.

Identificarea aminoacizilor se face prin pulverizarea cromatogramelor cu o soluţie de ninhidrină 0,2% în butanol sau de isatină 0,2% în acetonă + 1 ml acid acetic glacial, ca în cazul determinărilor de prolină şi oxiprolină.

R_F-ul fiecărui aminoacid se determină faţă de martorul respectiv.

Pentru determinarea cantitativă a aminoacizilor se decupează spoturile specifice fiecărui aminoacid. Fiecare probă se tratează cu 0,25 ml complex Barrollier [5]***). Se lasă 24 de ore la temperatura camerei şi se eluează apoi cu 5 ml metanol. Intensitatea culorii astfel obţinute se înregistrează electrofotometric, faţă de o probă martor.

REZULTATE

Animalele infectate cu *Mycobacterium tuberculosis* prezintă în general o scădere în concentraţia aminoacizilor liberi + polipeptidici (alanină, histidină, lizină, valină, leucină, acid aspartic, acid glutamic,

*) Sistem de developare butanol-acid acetic-apă (110 : 110 :30).

**) Sistem de developare fenol saturat cu apă.

***) 2,5 g ninhidrină + 150 ml acetonă + 0,112 g $CdCl_2$ + 0,5 ml acid acetic glacial.

glutamină) cît şi în concentraţia celor totali (acid γ-aminobutiric, izoleucină, cisteină) (tabelele 1 şi 2).

Tabela 1

Efectul administrării de streptomicină asupra concentraţiei aminoacizilor liberi şi polipeptidici din serul de la animale (cobai) infectate cu *Mycobacterium tuberculosis* H_{37} Rv mg/100 ml

Felul aminoacidului *)	Animale martore	Animale infectate	Animale infectate şi tratate cu streptomicină
Glicocol	86 ± 5	80 ± 1,5	83 ± 3,2
α-Alanină	250 ± 5,8	220 ± 1,8	270 ± 3,6
Acid α-aminobutiric	—	—	—
Acit γ-aminobutiric	—	—	—
Arginină	71 ± 1,5	71 ± 0,8	75 ± 0,9
Ornitină	40 ± 1,2	38 ± 1,3	39 ± 0,7
Histidină	120 ± 3,2	100 ± 4,5	135 ± 5,4
Lizină	195 ± 7	150 ± 8	190 ± 6
Valină	155 ± 8	135 ± 3,6	160 ± 4,5
Leucină	270 ± 10,1	220 ± 5,5	280 ± 6,3
Izoleucină	56 ± 1,7	50 ± 1,3	59 ± 2,2
Acid aspartic	820 ± 6,4	780 ± 7,7	795 ± 8,6
Acid glutamic	900 ± 23	750 ± 52	850 ± 55
Glutamină	60 ± 1,8	40 ± 1,7	66 ± 1,9
Metionină	100 ± 6,8	84 ± 5,3	106 ± 4,2
Homocisteină	—	—	—
Cisteină	200 ± 6,3	200 ± 2,4	210 ± 5,1
Cistină	170 ± 1,2	168 ± 3,2	174 ± 1,3
Prolină	385 ± 13	377 ± 6	390 ± 8
Serină	450 ± 16	440 ± 18	448 ± 12
Oxiprolină	—	—	—
Fenilalanină	120 ± 1,7	110 ± 5,3	130 ± 1,8
Tirozină	320 ± 2,7	327 ± 1,7	330 ± 4,7
Triptofan	290 ± 6,3	289 ± 5,5	300 ± 6,9
Treonină	480 ± 21	475 ± 16	476 ± 12

Tabela 2

Efectul administrării de streptomicină asupra concentraţiei aminoacizilor totali din serul de la animale (cobai) infectate cu *Mycobacterium tuberculosis* H_{37} Rv g/1 000 ml

Felul aminoacidului **)	Animale martore	Animale infectate	Animale infectate şi tratate cu streptomicină
Glicocol	1,30 ± 0,3	1,20 ± 1,7	1,25 ± 0,9
α-Alanină	1,70 ± 0,34	1,70 ± 0,1	1,68 ± 1,6
Acid α-aminobutiric	0,80 ± 0,5	0,82 ± 0,2	0,77 ± 0,3
Acid γ-aminobutiric	1,30 ± 0,6	1,00 ± 0,8	1,20 ± 0,66
Arginină	1,40 ± 0,08	1,37 ± 0,05	1,40 ± 0,16
Ornitină	1,57 ± 0,11	1,46 ± 0,7	1,39 ± 0,6
Histidină	3,20 ± 1,6	3,00 ± 1,1	3,00 ± 0,8
Lizină	2,20 ± 1,8	2,00 ± 2	2,00 ± 1,6
Valină	1,00 ± 0,15	0,95 ± 0,24	1,06 ± 1,6

*) Valorile pentru fiecare aminoacid reprezintă media datelor obţinute de la 10 determinări.

**) Valorile pentru fiecare aminoacid reprezintă media datelor obţinute de la 8 determinări.

Tabela 2 (continuare)

Felul aminoacidului	Animale martore	Animale infectate	Animale infectate şi tratate cu streptomicină
Leucină	2,50 ± 0,16	2,20 ± 0,76	2,52 ± 1,1
Izoleucină	1,40 ± 0,7	1,20 ± 0,6	1,70 ± 0,5
Acid aspartic	5,50 ± 0,52	5,40 ± 0,4	6,00 ± 1,1
Acid glutamic	11,00 + 0,64	11,00 ± 0,6	11,60 ± 0,4
Glutamină	1,60 ± 1,1	1,60 ± 1,1	1,50 ± 1,3
Metionină	0,47 ± 0,02	0,43 ± 0,05	0,55 ± 0,9
Serină	1,80 ± 0,5	2,20 ± 1,9	2,13 ± 0,4
Homocisteină	—	—	—
Cisteină	1,05 ± 0,15	0,60 ± 0,6	1,00 ± 1,8
Cistină	4,60 ± 0,37	5,00 ± 0,55	4,90 ± 1,4
Treonină	3,50 ± 0,45	3,30 ± 0,6	3,60 ± 0,44
Prolină	1,60 ± 1,5	1,50 ± 0,7	1,60 ± 1,4
Oxiprolină	—	—	—
Fenilalanină	0,85 ± 0,27	0,70 ± 0,08	0,72 ± 0,1
Tirozină	0,96 ± 0,22	0,76 ± 0,18	0,90 ± 0,15
Triptofan	1,16 ± 1,1	0,85 ± 1,3	1,20 ± 1,6

Animalele infectate şi supuse tratamentului cu streptomicină, prezintă o restabilire în concentraţia majorităţii aminoacizilor liberi + polipeptidici cît şi a celor totali spre valorile obţinute la animalele neinfectate (martore) (tabelele 1 şi 2).

CONCLUZII

1. Infectarea animalelor (cobai) pe cale subcutană cu 1/1000 mg *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Rv$ modfică echilibrul proteic azotat în sensul diminuării concentraţiei unor aminoacizi liberi şi polipeptidici şi a unor aminoacizi totali.

2. Administrarea zilnică de streptomicină, 32 mg/kg corp, timp de trei luni, duce spre o restabilire a dezechilibrului azotat produs la animalele martore infectate şi netratate.

Prezentată la redacţie la 2 aprilie 1962

Catedra de chimie biologică din I.M.F. Bucureşti, în colaborare cu colectivul de chimioterapie al Academiei R.P.R.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АМИНОКИСЛОТ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ У МОРСКИХ СВИНОК

РЕЗЮМЕ

В данной работе авторы исследовали содержание свободных и полипептидных аминокислот, а также общего содержания аминокислот в сыворотке контрольных животных (морских свинок), животных,

зараженных Mycobacterium tuberculosis $H_{37}Rv$, и животных, зараженных в тех же условиях, но подвергнувшихся лечению стрептомицином.

Подкожное заражение животных (морских свинок) 1/1 000 мг Mycobacterium tuberculosis $H_{37}Rv$ изменяет равновесие белкового азота в смысле уменьшения концентрации некоторых свободных и полипептидных аминокислот, а также и общего содержания аминокислот.

Ежедневное введение стрептомицина (32 мг/кг веса) в течение трех месяцев приводит к восстановлению равновесия азота, нарушенного у контрольных животных, зараженных и не подвергнутых лечению.

ÉTUDE DE L'AMINOACIDÉMIE DANS LA TUBÉRCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE

RÉSUMÉ

L'ouvrage présente une étude des acides aminés libres, de ceux contenus dans les polypeptides et des acides aminés totaux du sérum d'animaux témoins (cobayes) et d'animaux infectés au *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Rv$, dont une partie traités à la streptomycine.

L'infection des animaux (cobayes) par voie sous-cutanée avec 1/1000 mg *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Rv$ modifie l'équilibre protéique azoté dans le sens d'une diminution de la concentration des acides aminés totaux.

L'administration journalière de 32 mg par kg de poids corporel de streptomycine pendant 3 mois conduit au rétablissement du déséquilibre azoté produit chez les animaux témoins infectés et non traités.

BIBLIOGRAFIE

1. R. Vlădescu, I. V. Bălănescu, I. Tănase, L. Popa, C. Georgescu, El. Vochiţu, *Protidemia ca test diagnostic şi prognostic în tuberculoză*, Stud. şi cerc. de medicină internă, **1**, *2*, 235–242 (1960).
2. В. В. Рачински, *Бумажная хроматография*, Успехи химии, *1*, 12 (1950).
3. F. Savoia, *Modificazioni ala tecnica cromatografica. Note I. Cromatografia circolare*, Il Farmaco, Ed. Pratica, **XIII**, *11*, 598, 608, 612 (1958).
4. J. Barrollier, *Ein Ninhydrin Reagenz für quantitative Aminosäure Bestimmungen auf Papier Chromatogrammen*. Die Naturwissenschaft, **42**, 416 (1955).
5. S. Oeriu, I. Tănase, *Biochimia în biologia vîrstelor. Rolul aminoacizilor în mecanismul biochimic al proceselor de îmbătrînire la om*. Stud. şi cerc. de biochimie, **IV**, *3*, 300–305 (1961).

STUDIUL ACTIVITĂȚII COCARBOXILAZEI, TRANSAMINAZEI ȘI AL CAPACITĂȚII DE TRANSACETILARE ÎN PROCESELE DE ÎMBĂTRÎNIRE

DE

S. OERIU

MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R.P.R.

G. COSTESCU, O. TEODORESCU și I. ȘOIMU

Cercetările din ultima vreme cu privire la modificările biochimice ce au loc în procesele de îmbătrînire au evidențiat variații însemnate în concentrația vitaminelor B_1 [1], B_6 [2] și acid pantotenic [3], în funcție de vîrsta animalului.

Corelația acestor vitamine cu enzimele din a căror structură fac parte a pus problema studiului enzimelor respective, și anume cocarboxilaza, transaminaza și transacetilaza.

Cercetările făcute de S. Oeriu [4] — [12] asupra restabilirii echilibrului biochimic observat la animalul bătrîn, spre cel propriu animalului tînăr, au demonstrat rolul cisteinei în acest mecanism.

De aici s-a desprins nevoia studiului eventualelor modificări ale activității acestor enzime la animalul bătrîn supus acțiunii cisteinei timp mai îndelungat.

Rolul vitaminelor de metilare și de metabolizare a sulfului în acțiunea de potențare a cisteinei în sinteza proteică pune problema studiului activității enzimatice și în condițiile administrării acestor vitamine, singure și în asociație cu cisteina.

MATERIAL ȘI METODE DE LUCRU

S-au folosit 90 de șobolani tineri (între 2—3 luni) și 536 șobolani bătrîni (de peste 2 ani). Animalele bătrîne au fost grupate în 8 loturi a cîte 67 de animale fiecare. Din aceste 8 loturi, unul a reprezentat lotul de animale martore netratate; loturile 2, 3, 4 și 5 au primit cisteină intramuscular,

cîte 0,0299 g/kg corp ; loturile 3, 4 şi 5 au primit în afară de cisteină, una din vitaminele menţionate : vitamina B_6 (0,00175 g/kg corp) sau vitamina B_{12} (0,083 γ/kg corp) pe cale intramusculară sau acid folic (0,05 mg/kg corp) „per os" ; loturile 6, 7 şi 8 au primit una din vitaminele B_6, B_{12} sau acid folic în dozele menţionate, fără a se mai administra şi cisteină. Tratamentul s-a aplicat zilnic, timp de 21 de zile. Recoltarea sîngelui s-a făcut prin puncţie în cord.

Tratamentul a durat 21 de zile.

Decarboxilarea acidului piruvic sub acţiunea holoenzimei rezultată din unirea cocarboxilazei din sînge cu apocarboxilaza preparată din drojdia de bere s-a evaluat manometric, după metoda descrisă de W.W.Kay şi K. C. Murfitt [13].

Activitatea transaminazelor (GOT şi GPT) s-a determinat în serul sangvin, după metoda lui P. Bruyet şi colaboratori [14].

α - Cetoacizii sintetizaţi prin reacţiile de transaminare sînt transformaţi în hidrazonele corespunzătoare (cu ajutorul 2,4-dinitrofenil-hidrazinei) care se determină fotometric.

Capacitatea de transacetilare a ţesutului hepatic s-a determinat după O. N. Sîtinskaia, prin administrarea intraperitoneală de acid *p*-aminobenzoic (PAB) şi evaluarea cantităţii de acid *p*-aminobenzoic acetilat [15].

REZULTATE

Valorile medii ale activităţii cocarboxilazei, transaminazelor (GOT şi GPT) şi a capacităţii de transacetilare sînt redate în tabela centralizatoare, din care rezultă :

A. Activitatea cocarboxilazei din sîngele animalelor bătrîne prezintă valori mai scăzute (13,13 γ%) faţă de valorile obţinute la animalele tinere (26,13 γ%).

Tratamentul cu cisteină produce o creştere a activităţii cocarboxilazei din sîngele animalelor bătrîne, pînă la o medie de 26,48 γ%, faţă de media 26,13γ% obţinută la animalele tinere.

Tratamentul cu vitamină B_6 şi cu cisteină asociată cu vitamina B_6 produce de asemenea o creştere în activitatea acestei enzime (24,32 γ% şi respectiv 21,84γ%). Valorile obţinute în ambele tratamente tind către valorile corespunzătoare animalelor tinere (26,13 γ%).

Tratamentul cu vitamină B_{12} şi cu cisteină asociată cu vitamina B_{12} produce şi el o creştere a activităţii cocarboxilazei (27,60γ% şi respectiv 22,04γ%), valorile tinzînd către cele obţinute la animalele tinere.

Tratamentul cu acid folic şi cu cisteină asociată cu acid folic pune în evidenţă o creştere mai mică în activitatea cocarboxilazei (20,67 γ% şi 16,53γ%) faţă de valorile obţinute la animalele bătrîne netratate.

B. Activitatea transaminazelor serice (glutamin-oxalacetic-transaminaza şi glutamic-piruvic-transaminaza) pune în evidenţă diferenţe în valorile găsite la animalele bătrîne faţă de cele tinere (2,33 μ moli faţă de 1,80 μ moli pentru GOT şi 1,55 faţă de 1,10 pentru GPT).

Tabelă

Valorile medii ale activității enzimatice a cocarboxilazei (în γ CO_2/100 ml sînge), a transaminazelor — GOT și GPT — (în μmoli acid piruvic/ml sînge/oră) și a capacității de acetilare a țesutului hepatic (în mg PAB% țesut umed) la animale în funcție de vîrstă (șoboani tineri de 2—3 luni și bătrîni de 2 ani), față de cele obținute la animale bătrîne sub acțiunea cisteinei, a cisteinei în asociere cu una din vitaminele B_6, B_{12} sau acid folic, ca și sub acțiunea separată a fiecăreia din aceste vitamine

	Cocarboxilaza	T	P%	GOT	T	P%	GPT	T	P%	Capacitate de acetilare a țesutului hepatic	T	P%
Martori												
Tineri	26,13 ±1,29	8,02	<0,001	1,80 ±0,08	4	<0,01	1,10 ±0,10	3,2	<0,01	7,45 ±0,23	15,6	<0,001
Bătrîni	13,13 ±1,90			2,30 ±0,08			1,55 ±0,02			2,76 ±0,19		
Animale bătrîne tratate												
Cisteină	26,48 ±1,90	5,80	<0,001	1,60 ±0,16	4	<0,01	1,15 ±0,13	4	<0,01	3,84 ±0,24	3,5	<0,01
Cisteină + B_6	21,84 ±1,53	4,25	<0,01	3,10 ±0,21	3,6	<0,01	1,85 ±0,15	1,8	<0,1	4,88 ±0,30	6,05	<0,001
Cisteină + B_{12}	22,04 ±1,77	4,17	<0,01	2,00 ±0,15	1,8	<0,1	1,40 ±0,18	0,7	<0,1	4,73 ±0,24	24	<0,001
Cisteină + acid folic	16,53 ±1,36	1,8	<0,1	1,70 ±0,16	3,5	<0,01	1,10 ±0,15	2,4	<0,05	2,88 ±0,16	0,42	<0,5
Vitamina B_6	24,32 ±1,04	7,15	<0,001	4,20 ±0,14	12	<0,01	2,20 ±0,47	1,3	<0,1	2,23 ±0,07	2,5	<0,05
Vitamina B_{12}	27,60 ±1,30	7,9	<0,001	2,80 ±0,36	1,4	<0,1	1,60 ±0,10	0,3	<0,1	2,77 ±0,22	0,03	<0,5
Acid folic	20,07 ±1,84	3,38	<0,01	2,80 ±0,25	2	<0,1	1,60 ±0,26	0,16	<0,1	2,61 ±0,52	0,27	<0,5

Tratamentul cu cisteină produce o scădere a activității ambelor enzime de transaminare (1,60 μmoli pentru GOT și 1,15 μmoli pentru GPT), valori apropiate de cele corespunzătoare animalelor tinere.

Tratamentul cu vitamină B_6 și cu cisteină asociată cu vitamina B_6 produce o stimulare a activității transaminazice pentru GOT (4,20 μmoli și respectiv 3,10 μmoli) și pentru GPT (2,20 μmoli și respectiv 1,85 μmoli); la animalele tinere valorile respective erau mai scăzute (1,80 μmoli pentru GOT și 1,10 μmoli pentru GPT).

Tratamentele cu vitamină B_{12} și cu cisteină asociată cu vitamina B_{12} nu produc modificări semnificative în activitatea acestor enzime. Astfel, pentru GOT s-au obținut valori de 2,80 μmoli și respectiv 2,00 μmoli, iar pentru GPT valori de 1,60, respectiv 1,40 μmoli.

La tratamentele cu cisteină + acid folic, se înregistrează valori ale activității ambelor transaminaze, apropiate de cele corespunzătoare animalelor tinere (1,70 μmoli față de 1,80 μmoli pentru GOT și 1,10 față de 1,10 μmoli pentru GPT). Tratamentul simplu cu acid folic nu prezintă deosebiri semnificative față de valorile corespunzătoare animalelor bătrîne.

C. Capacitatea de transacetilare a ţesutului hepatic prezintă valori diferenţiate la animalele bătrîne faţă de cele tinere (2,76 mg PAB% faţă de 7,45 mg PAB%).

Tratamentul cu cisteină produce o stimulare a activităţii transacetilazice (3,84 mg PAB%) în raport cu valorile obţinute la animalele bătrîne.

Tratamentul cu vitamina B_6 nu produce modificări ale activităţii transacetilazice (2,23 mg PAB%) faţă de cea a animalelor bătrîne (2,76 mg PAB%), în timp ce asocierea cisteinei la tratament produce o creştere a capacităţii de transacetilare, atingînd valoarea medie de 4,88 mg PAB%.

Tratamentele cu vitamina B_{12} şi cu cisteină asociată cu vitamina B_{12} duc la aceleaşi rezultate ca şi în cazul anterior. Astfel tratamentul cu vitamina B_{12} nu produce modificări ale capacităţii de transacetilare (2,77 mg PAB%) faţă de animalele bătrîne, în timp ce asocierea cisteinei la acest tratament produce o creştere a activităţii, care atinge valoarea medie de 4,73 mg PAB%.

Tratamentele cu acid folic şi cu cisteină asociată cu acid folic nu duc la modificarea capacităţii de transacetilare a ţesutului hepatic la animalele bătrîne (2,61 mg PAB%, respectiv 2,88 mg PAB%).

CONCLUZII

— Animalele bătrîne prezintă valori mai scăzute decît cele tinere, în ceea ce priveşte activitatea cocarboxilazei şi capacitatea de transacetilare; activitatea transaminazelor (GOT şi GPT) este mai mare la animalele bătrîne.

— Animalele bătrîne tratate cu cisteină prezintă modificări în activitatea enzimelor studiate, în sensul că valorile obţinute sub acţiunea acestui tratament tind spre valorile proprii animalelor tinere.

— Aceeaşi tendinţă de apropiere de valorile corespunzătoare animalelor tinere, se observă şi în cazul tratamentelor atît cu vitaminele B_6 şi B_{12} cît şi cu cisteină asociată cu aceste vitamine, în care activitatea cocarboxilazei la animalele bătrîne prezintă valori asemănătoare celor corespunzătoare animalelor tinere. De asemenea, în cazul activităţii transaminazelor (GOT şi GPT) s-a înregistrat aceeaşi tendinţă de apropiere de valorile corespunzătoare animalelor tinere în cazul tratamentului cu acid folic asociat cu cisteină.

— În ceea ce priveşte capacitatea de transacetilare, tratamentul cu cisteină asociată cu vitaminele B_6 şi B_{12}, aplicat animalelor bătrîne, produce o modificare a acestor valori, care tind şi ele să se apropie de cele corespunzătoare animalelor tinere, însă într-o măsură mai mică.

Prezentată la redacţie la 2 aprilie 1962

Catedra de biochimie a Facultăţii de medicină generală din I.M.F., Bucureşti

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ КОКАРБОКСИЛАЗЫ, ТРАНСАМИНАЗЫ И СПОСОБНОСТИ ТРАНСАЦЕТИЛИРОВАНИЯ В ПРОЦЕССАХ СТАРЕНИЯ

РЕЗЮМЕ

Исследование активности кокарбоксилазы, трансаминазы и способности трансацетилирования в связи с возрастом животного, а у старых животных в связи с лечением цистеином и витаминами B_6, B_{12} и фолиевой кислотой, а также цистеином вместе с этими витаминами, приводит к следующим результатам:

— у старых животных активность кокарбоксилазы и способность к трансацетилированию представляют более низкие значения, чем у молодых; активность трансаминаз (GOT и GPT) больше у старых животных.

— Старые животные, которым вводили цистеин, представляют изменения в активности исследованных энзим в том смысле, что под влиянием этого лечения его значения приближаются к значениям, характерным для молодых животных.

ACTIVITÉ DE LA CO-CARBOXYLASE ET DE LA TRANSAMINASE ET CAPACITÉ DE TRANSACÉTYLATION DANS LES PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT

RÉSUMÉ

L'activité de la co-carboxylase et de la transaminase et la capacité de transacétylation en fonction de l'âge ont été étudiées sur des animaux jeunes et des animaux vieux, soumis au traitement à la cystéine, aux vitamines B_6, B_{12} et à l'acide folique, ainsi qu'à la cystéine associée à ces vitamines. On a constaté les faits suivants :

— L'activité de la co-carboxylase et la capacité de transacétylation sont moins intenses chez les vieux animaux que chez les animaux jeunes, par contre l'activité des transaminases (GOT et GPT) est plus grande chez les vieux animaux.

— Chez les vieux animaux traités à la cystéine, l'activité des enzymes étudiées atteint des valeurs qui se rapprochent de celles propres aux animaux jeunes ; la capacité de transacétylation est influencée dans le même sens mais dans une mesure beaucoup plus faible.

BIBLIOGRAFIE

1. K. Shiga, *Excerpta Medica Gerontology and Geriatrics*, **2**.
2. E. Ranke, A. Sauley, M. D. Tauber, J. of Gerontology, **XV**, *1*, 41 (1960).
3. S. Oeriu, M. Oancea, St. Balliu, Studii şi cercetări de biochimie, *2*, 24—27 (1961).
4. S. Oeriu, C. Russu, I. Cruceanu, Studii şi cercetări de biochimie, *2*, 19—23 (1961).

5. S. OERIU, *The effect of cysteine on the methionine content in plant and animal organism. The Origin of Life on the Earth*, Pergamon Press, London, 1959, 572—577.
6. S. OERIU, G. COSTESCU, O. TEODORESCU, Studii şi cercetări de biochimie, **III**, *3*, 245 (1960).
7. S. OERIU, G. COSTESCU, O. TEODORESCU, *Conferinţa naţională de fiziologie*, iunie 1960, Rezumatele comunicărilor, p. 112.
8. S. OERIU, G. COSTESCU, O. TEODORESCU, *Fourth International Congress on Clinical Chemistry*, Edinburgh, Scotland, aug. 1960, Programme, p. 40.
9. S. OERIU, I. TĂNASE, *Fifth International Congress of Gerontology*, San Francisco, aug. 1960, Final Program, p. 84.
10. S. OERIU, I. TĂNASE, *Fifth International Congress of Gerontology*, San Francisco, aug. 1960, Final Program, p. 84.
11. S. OERIU, M. TIGHECIU, Studii şi cercetări de biochimie, **2**, 16—18 (1961).
12. S. OERIU, I. SOIMU, Zeitschrift für Alternsforschung, **15**, *4*, 303—307 (1962).
13. W. W. KAY, K. C. MURFITT, Biochem. Journ., **6** *4*, 601 (1956).
14. P. BRUYET et colab., Ann. Biol. Clin., *10—12*, 661 (1958)
15. О. Н. СЫТИНСКАЯ, Вопросы медицинской химии, *3*, 214—221 (1956).

STUDIUL ACTIVITĂȚII UNOR ENZIME DE OXIDO-REDUCERE ÎN PROCESELE DE ÎMBĂTRÎNIRE

DE

S. OERIU
MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R.P.R.
M. TIGHECIU-DUMITRESCU și L. ENACHE-PEREDERI

Studiul mecanismului biochimic în biologia vîrstelor ridică problema interrelațiilor, în anumite condiții, ale unor componenți cu un rol mai important în procesele metabolice.

Micșorarea în funcție de vîrstă a concentrației aminoacizilor liberi și totali (arginină, ornitină, prolină, triptofan) [1], [2] ce stau la baza sintezei vitaminei PP și utilizarea micșorată a vitaminelor PP în tulburările echilibrului biochimic al cisteinei [3], [4], precum și valoarea scăzută a vitaminelor PP și B_2 la animalul bătrîn și acțiunea cisteinei asupra restabilirii echilibrului acestora [5], au orientat cercetările noastre spre studiul activității difosfopiridin-nucleotidului (DPN), flavin-adenin-nucleotidului (FAD) și a flavin-mononucleotidului (FMN), în funcție de vîrsta animalului și sub acțiunea cisteinei [6].

Rolul vitaminelor de metilare și de metabolizare a sulfului asupra acțiunii cisteinei în restabilirea echilibrului biochimic tulburat la animalul bătrîn spre cel propriu animalului tînăr [7] a făcut necesar studiul activității enzimatice la animalul bătrîn și sub acțiunea administrării acestor vitamine.

MATERIAL ȘI METODĂ DE LUCRU

S-au pus în lucru 34 animale (șobolani) tinere între 2—3 luni și 160 animale bătrîne de 2 ani.

Animalele bătrîne au fost grupate în 8 loturi a cîte 20; primul lot îl formează animalele martore; loturile 2—8 au fost supuse timp de 3 săptămîni următorului tratament zilnic: loturile 2, 3, 4 și 5 au primit cisteină

zilnic, intramuscular, cîte 0,0299 g/kg corp; loturile 3, 4 şi 5 au primit zilnic, în afară de cisteină, una din vitaminele menţionate: vitamina B_6 (0,00175 g/kg corp) sau vitamina B_{12} (0,083 γ/kg corp), pe cale intramusculară, sau acid folic (0,05 mg/kg corp) „per os"; loturile 6, 7 şi 8 au primit zilnic, în dozele menţionate şi pe calea indicată, numai una din vitaminele B_6, B_{12} sau acid folic.

Recoltarea sîngelui s-a făcut prin puncţie în cord.

S-a determinat activitatea DPN în sînge şi a FAD şi FMN în ficat.

Tabelă

Valorile medii ale activităţii enzimatice a DPN (exprimată în μl CO_2 ml/30 min) şi a FAD şi FMN (exprimată în μg de riboflavină pe 1 g ţesut umed), în funcţie de vîrsta animalelor (şobolani tineri de 2—3 luni şi bătrîni de 2 ani); la cele bătrîne şi în funcţie de tratament cu cisteină sau una din vitaminele B_6, B_{12}, acid folic, precum şi cisteină în asociere cu una din aceste vitamine

	DPN	T	P%	FAD	T	P%	FMN	T	P%
Animale martore									
Tinere	268,8±7,7	4,91	<0,01	30,34±0,48	5,91	<0,01	10,94±0,30	3,66	<0,02
Bătrîne	212,5±8,5			26,38±0,47			9,18±0,39		
Animale bătrîne tratate									
Cisteină	301,7±8,1	7,6	<0,01	27,47±0,39	1,76	>0,01	9,75±0,37	1,07	>0,01
Cisteină+B_{12}	353,9±19,8	6,56	<0,01	26,84±0,50	0,66	>0,01	9,01±0,53	0,26	>0,01
Vitamina B_{12}	352,9±10,7	10,28	<0,01	27,00±0,32	1,10	>0,01	8,44±0,24	1,64	>0,01
Cisteină + B_6	276,0±16,0	3,5	<0,01	27,14±0,55	1,05	>0,01	8,92±0,36	0,49	>0,01
Vitamina B_6	268,4±13,8	3,45	<0,01	27,07±0,34	1,18	>0,01	9,30±0,44	0,21	>0,01
Cisteină + acid folic	223,9±18,2	0,57	>0,01	28,15±0,68	2,14	<0,01	9,42±0,50	0,39	>0,01
Acid folic	163,1±11,9	3,38	<0,01	27,96±0,58	2,85	<0,05	9,26±0,33	0,15	>0,01

La determinarea DPN în sînge s-a folosit metoda B. J. Jandorf, F. W. Klemperer şi B. Hastings [8], al cărei principiu se bazează pe conversia enzimatică a hexozofosfatului în acizii glicerofosforic şi fosfogliceric, intensitatea conversiei fiind proporţională cu cantitatea de DPN.

La determinarea FAD şi FMN din ficat s-a folosit metoda Cerleti P.-Ipota P. [9] al cărei principiu se bazează pe separarea pe coloană de amberlit I.R.C. 50 H a flavinelor extrase din ţesuturi şi fluorometrarea lor, raportată la o soluţie standard de riboflavină.

REZULTATE

Animalele bătrîne prezintă faţă de cele tinere valori scăzute în activitatea enzimatică: DPN cu 14,9%, FAD cu 15%, FMN cu 19%.

Sub acţiunea vitaminei B_6 sau a cisteinei + vitamina B_6 se restabileşte activitatea enzimatică a DPN-ului spre valori proprii organismului tînăr; cisteina, vitamina B_{12} şi cisteina + vitamina B_{12} duc la depăşirea valorilor organismului tînăr. Acidul folic micşorează activitatea DPN-ului, iar cisteina + acid folic nu o influenţează. Cisteina + acid folic influenţează activitatea enzimatică a FAD, nu şi pe aceea a FMN.

CONCLUZII

— Activitatea DPN-ului scade cu vîrsta animalului; şobolanii bătrîni (2 ani) prezintă faţă de animalele tinere (2—3 luni) o scădere medie de 14,9%. În aceleaşi condiţii de lucru, valorile medii ale FAD şi FMN sînt şi ele scăzute : FAD cu 15% şi FMN cu 19%.

— Administrarea de cisteină, vitamine B_6, B_{12} (intramuscular) sau acid folic (per os) sau de cisteină plus una din vitaminele menţionate nu influenţează activitatea FAD şi FMN.

— În aceleaşi condiţii experimentale, activitatea DPN-ului creşte în medie cu 50% faţă de valoarea observată la animalele bătrîne netratate, de unde apare prezenţa unei relaţii dintre restabilirea concentraţiei vitaminei PP şi a activităţii DPN-ului sub acţiunea cisteinei la animalul bătrîn. Vitaminele B_6 şi B_{12}, nu însă şi acidul folic, stimulează activitatea DPN-ului.

— Acţiunea vitaminei B_6 se explică prin rolul ei în metabolizarea sulfului, iar aceea a vitaminei B_{12} prin activitatea ei asupra proceselor de metilare, amîndouă vitaminele exercitînd direct şi indirect influenţa lor asupra metabolizării cisteinei.

Prezentată la redacţie la 2 aprilie 1962

Catedra de biochimie a Facultăţii de medicină generală din I.M.F., Bucureşti

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ЭНЗИМОВ В ПРОЦЕССАХ СТАРЕНИЯ

РЕЗЮМЕ

Активность DPN уменьшается с возрастом животных: старые крысы (двухгодичные) имели, по сравнению с молодыми животными (двух- и трехмесячными), среднее снижение активности DPN, равное 14,9%. В тех же условиях работы средние значения FAD и FMN также понижены: FAD на 15% и FMN на 19%.

Введение цистеина и витаминов B_6 и B_{12} (внутримышечное) или же фолиевой кислоты (per os), или цистеина вместе с одним из вышеупомянутых витаминов не влияет на активность FAD и FMN. В тех же экспериментальных условиях активность DPN возрастает в среднем на 50% в сравнении со значением, полученным для старых животных, не подвергнувшихся лечению; отсюда вытекает наличие связи между восстановлением концентрации витамина PP и активностью DPN, под влиянием цистеина, у старого животного. Витамины B_6 и B_{12} стимулируют активность DPN, а фолиевая кислота не оказывает никакого влияния.

ACTIVITÉ DE CERTAINES ENZYMES D'OXYDO-RÉDUCTION DANS LES PROCESSUS DE VIEILLISSEMENT

RÉSUMÉ

L'activité du DPN diminue avec l'âge de l'animal; les vieux rats (de 2 ans) présentent par rapport aux jeunes (de 2—3 mois) un abaissement moyen de 14,9%. Dans les mêmes conditions les valeurs moyennes du FAD et du FMN sont aussi diminuées : de 15% pour le FAD et de 19% pour le FMN.

L'administration (intramusculaire) de la cystéine, des vitamines B_6 et B_{12} ou (orale) de l'acide folique, ou bien de la cystéine associée à l'une des vitamines citées, n'influence pas l'activité du FAD et du FMN. Dans les mêmes conditions expérimentales l'activité du DPN s'accroît en moyenne de 50% par rapport aux vieux animaux non traités, ce qui révèle la présence d'une relation entre le rétablissement de la concentration en vitamine PP et celui de l'activité du DPN sous l'action de la cystéine chez les vieux animaux. Les vitamines B_6 et B_{12} (mais non l'acide folique) stimulent l'activité du DPN.

BIBLIOGRAFIE

1. S. OERIU, I. TĂNASE, *International Association of Gerontology. Fifth Congress*, San Francisco, aug. 1960, Final Program, p. 41.
2. S. OERIU , I. TĂNASE, *Fourth International Congress on Clinical Chemistry*, aug. 1960, Edinburgh, Scotland, Programme, p. 42.
3. A. E. BRAUNSTEIN, Advances in Protein Chemistry, **III**, 2 (1947).
4. А. Е. БРАУНШТАЙН, *Биохимия аминокислотного обмена*, Изд. Акад. медицинских наук СССР, Москва, 1949.
5. S. OERIU, C. RUSSU, I. CRUCEANU, Studii şi cercetări de biochimie, *2*, 19—23 (1961).
6. M. TIGHECIU-DUMITRESCU, L. ENACHE-PEREDERI, *Al V-lea Congres internaţional de biochimie*, Moscova, august 1961.
7. S. OERIU, *Al V-lea Congres internaţional de biochimie*, Moscova, august 1961.
8. B. J. JANDORF, F. W. KLEMPERER, B. HASTINGS, J. Biol. Chem., **138**, 311 (1941).
9. P. CERLETI, P. IPOTA, Biochem. J., **75**, 119 (1960).

DINAMICA FOSFORULUI LIPIDIC ÎN FUNCȚIE DE VÎRSTA ANIMALULUI ȘI SUB ACȚIUNEA UNOR SUBSTANȚE PROPRII ORGANISMULUI

DE

S. OERIU
MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R.P.R.

G. GRIGORESCU și M. MĂNESCU

Procesele de îmbătrînire duc la numeroase tulburări ce se reflectă în echilibrul protidic, glucidic și lipidic. Studiul unor astfel de modificări în funcție de vîrsta animalului a făcut obiectul a numeroase cercetări. Printre lucrările asupra tulburărilor lipidice, sînt de relevat cercetările făcute de J. Hrachovec [1]—[3], care evidențiază o creștere a valorilor fosforului lipidic la iepurele de 5 zile față de cele observate în a 27-a zi a vieții embrionare, pentru a găsi apoi la animalul adult valori scăzute față de cele obținute la embrion.

În lucrarea de față ne-am propus să urmărim la șobolani de diferite vîrste (tineri între 2—3 luni și bătrîni de 2 ani) eventualele modificări ale fosforului lipidic în organe (ficat și creier) și în serul sangvin.

Dată fiind acțiunea cisteinei asupra restabilirii echilibrului biochimic al animalului bătrîn spre valorile proprii organismului tînăr [4]—[6], ne-am propus studiul fosforului lipidic la animalul bătrîn și sub acțiunea cisteinei. Rolul vitaminei B_{12} și al acidului folic în procesele de metilare și al vitaminei B_6 în metabolizarea sulfului, precum și acțiunea acestora asupra restabilirii echilibrului biochimic tulburat la animalul bătrîn [7]—[10], au dus la studiul modificărilor fosforului lipidic în condițiile administrării acestor vitamine, singure și în asociere cu cisteina, ele exercitînd un rol direct și indirect asupra metabolizării cisteinei.

MATERIAL ȘI METODĂ DE LUCRU

S-au folosit 40 de șobolani tineri (de 2—3 luni) și 160 de șobolani bătrîni (de 2 ani). Animalele bătrîne au fost grupate în 8 loturi de cîte 20; primul lot îl formează animalele martore; loturile 2, 3, 4 și 5 au primit

cisteină intramuscular, cîte 0,0299 g/kg corp; loturile 3, 4 şi 5 au primit, în afară de cisteină, una din vitaminele menţionate : vitamina B_6 (0,00175 g/kg corp) sau vitamina B_{12} (0,083 γ/kg corp), pe cale intramusculară, sau acid folic (0,05 mg/kg corp) „per os"; loturile 6, 7 şi 8 au primit una din vitaminele B_6, B_{12} sau acid folic în dozele menţionate, fără a se mai administra şi cisteină. Tratamentul s-a aplicat zilnic, timp de 21 de zile.

Recoltarea sîngelui s-a făcut prin puncţie în cord.

Determinarea fosforului lipidic din organe (creier şi ficat) şi din serul sangvin s-a făcut după metoda indicată de H. C. Fiske şi Y. Subarov [11]. Principiul metodei constă în mineralizarea lipidelor extrase şi transformarea acidului fosforic obţinut în acid fosfomolibdenic, care cu acidul 1-amino-2-naftol-4-sulfonic se reduce în oxizi de molibden de culoare albastră, a cărei intensitate se determină fotocolorimetric.

REZULTATE

Determinările fosforului lipidic (v. tabela) evidenţiază o scădere a fosforului lipidic din ficat şi serul sangvin al animalului bătrîn. Valorile

Tabelă

Valorile medii ale concentraţiei fosforului lipidic din ficat şi creier în mg/100 g ţesut umed) şi din serul sangvin (în mg/100 ml ser) la animale în funcţie de vîrstă (şobolani tineri de 2—3 luni şi bătrîni de 2 ani) faţă de cele obţinute la animale bătrîne sub acţiunea cisteinei, a cisteinei în asociere cu una din vitaminele B_6, B_{12} sau acid folic, ca şi acţiunea separată a fiecăreia din aceste vitamine

	Ser	T	P%	Ficat	T	P%	Creier	T	P%
Animale martore									
Tinere	3,91±0,129	8,23	<0,001	139,7±2,78	4,31	<0,001	219,15±6,9	0,34	>0,05
Bătrîne	2,74±0,059			114,5±5,12			222,6 ±7,9		
Animale bătrîne tratate									
Cisteină	3,34±0,29	2,93	>0,05	149,7±3,7	5,56	<0,001	217,4 ±6,52	0,52	>0,05
Cisteină + B_6	3,18±0,118	3,35	<0,01	144,8±5,1	4,2	<0,001	223,13±4,43	0,058	>0,1
Cisteină + B_{12}	3,13±0,33	1,16	>0,05	122,25±1,17	1,47	>0,05	202,6 ±5,69	2	0,05
Acid folic	3,48±0,125	5,37	<0,001	131,1±2,88	2,83	<0,01	198,4 ±6,1	2,09	0,05
Vitamina B_6	3,06±0,17	1,78	>0,05	138,8±4,77	3,46	<0,01	221,4 ±3,32	0,14	>0,1
Vitamina B_{12}	3,33±0,12	4,42	<0,01	126,6>3,21	2	>0,05	188,5 ±3,38	3,9	<0,01
Acid folic	3,93±0,17	5,26	<0,001	121 ±1,93	1,18	>0,05	216 ±6	0,66	> 0,05

fosforului lipidic din creier nu prezintă modificări în funcţie de vîrsta animalului.

Cisteina, vitamina B_6 şi cisteina + vitamina B_6 influenţează valorile fosforului lipidic din ficat; vitaminele B_{12}, acidul folic, cisteina + vitamina B_6 şi cisteina + acid folic pe cele din serul sangvin. Fosforul lipidic din creier nu este influenţat.

CONCLUZII

1. La animalul bătrîn au loc tulburări biochimice ce determină o micșorare în concentrația fosforului lipidic în ficat și serul sangvin.

2. Sub acțiunea cisteinei administrate, valorile concentrației fosforului lipidic din creier la animalul bătrîn rămîn nemodificate ; cele din serul sangvin suferă modificări nesemnificative, iar cele din ficat tind, în mod semnificativ, spre valorile observate la animalul tînăr. Cisteina, vitamina B_6 și cisteina + vitamina B_6 influențează valorile fosforului lipidic din ficat spre valorile proprii animalelor tinere ; în același sens acționează asupra valorilor din serul sangvin vitamina B_{12} și acidul folic, cisteina + vitamina B_6 și cisteina + acid folic.

3. Posibilitatea de a influența în mod semnificativ echilibrul biochimic al fosfolipidelor din ficatul animalului bătrîn, cu cisteină, spre valorile proprii animalelor tinere, prezintă interes ; de asemenea și potențarea pe care acidul folic în asociere cu cisteina o exercită asupra fosforului lipidic din serul sangvin.

Prezentată la redacție la 2 aprilie 1962

Catedra de biochimie a Facultății de medicină generală din I.M.F., București

ДИНАМИКА ЛИПИДНОГО ФОСФОРА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА ЖИВОТНОГО И ВЛИЯНИЯ НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВЕННЫХ ОРГАНИЗМУ ВЕЩЕСТВ

РЕЗЮМЕ

1. У старых животных происходят биохимические изменения, которые вызывают понижение концентрации липидного фосфора печени и кровяной сыворотки.

2. Под влиянием введенного цистеина значения концентрации липидного фосфора в мозгу старых животных остаются неизмененными; в кровяной сыворотке происходят незначительные изменения, а в печени концентрация явно приближается к значениям, полученным для молодого животного. Цистеин, витамин B_6 и цистеин вместе с витамином B_6 влияют на значения липидного фосфора печени, приближая их к значениям, свойственным молодым животным; в таком же смысле влияют на значения в кровяной сыворотке витамин B_{12} и фолиевая кислота, цистеин вместе с витамином B_6 и цистеин вместе с фолиевой кислотой.

3. Представляет интерес возможность довести, под действием цистеина, биохимическое равновесие фосфолипидов в печени старого животного до значений, свойственных молодым животным, а также возможность влиять на содержание липидного фосфора в кровяной сыворотке, под действием цистеина вместе с фолиевой кислотой.

DYNAMIQUE DU PHOSPHORE LIPIDIQUE EN FONCTION DE L'ÂGE DE L'ANIMAL ET SOUS L'ACTION DE CERTAINES SUBSTANCES PROPRES À L'ORGANISME

RÉSUMÉ

1. Chez le vieil animal des troubles biochimiques déterminent une diminution de la teneur en phosphore lipidique du foie et du sérum sanguin.

2. Après administration de la cystéine, les valeurs de la concentration en phosphore lipidique du cerveau chez les vieux animaux demeurent inchangés ; celles du sérum sanguin éprouvent des modifications insignifiantes et celles du foie tendent d'une manière significative vers les valeurs observées chez l'animal jeune. La cystéine et la vitamine B_6 administrées séparément ou associées orientent les valeurs du phosphore lipidique du foie vers des valeurs propres aux animaux jeunes et c'est dans le même sens qu'agissent sur les valeurs du sérum sanguin la vitamine B_{12}, l'acide folique, la cystéine + la vitamine B_6 et la cystéine + l'acide folique.

3. La possibilité d'influer d'une manière significative, grâce à la cystéine, sur l'équilibre biochimique des phospholipides du foie de l'animal vieux en l'orientant vers des valeurs propres à l'animal jeune présente de l'intérêt ; tout comme l'effet positif qu'exerce l'acide folique associé à la cystéine sur le phosphore lipidique du sérum sanguin.

BIBLIOGRAFIE

1. J. HRACHOVEC, C. R. Soc. Ac. Sc., **242**, 299—301 (1956).
2. J. HRACHOVEC, C. R. Ac. Sc., **243**, 415 — 418 (1956).
3. J. HRACHOVEC, Revue Française de Gérontologie, août 1958.
4. S. OERIU, *The effect of cysteine on the methionine content in plant and animal organism. The Origin of Life on the Earth*, Pergamon Press, London, 1959, 572—577.
5. S. OERIU, Revue de Chimie, **III** *1*, 119 (1958.)
6. К. И. ПАРХОН, С. ОЕРИУ, Биохимия АН СССР, Москва, **25**, *1*, 61 (1960).
7. S. OERIU, I. TĂNASE, *Fifth International Congress of Gerontology*, august 1960, San Francisco, California, Final Program, p. 41.
8. S. OERIU, *Nouvelles données biochimiques dans la biologie des différents âges*. Revue des Sciences Médicales, Acad. R.P.R., 1961.
9. S. OERIU, Some new biochemical findings on the biology of age changes. Al V-lea Congres international de biochimie, Moscova, 1961, Lucrările Congresului, p. 147.
10. G. GRIGORESCU, M. UNGUREANU, *Étude du phosphore lipidique en fonction de l'âge de l'animal et sous l'effet de la cystéine*. V-ème Congrès International de Biochimie, Moscou, août 1961.
11. H. C. FISKE, Y. SUBAROV, J. Biol. Chem., **66**, 375 (1926).

CERCETĂRI ASUPRA CARACTERELOR BIOCHIMICE SPECIALE ALE PORUMBULUI

II. DESPRE POTENȚIALUL REDOX AL BOABELOR DE PORUMB

DE

C. BODEA și T. LÁSZLÓ

Numeroasele sisteme oxido-reducătoare ce joacă un rol hotărîtor în procesele metabolice din organismele vii determină existența în țesuturi a unui anumit potențial redox. Valoarea potențialului redox depinde de natura sistemelor oxido-reducătoare reversibile coexistente, de influența reciprocă între aceste sisteme și de factori din interiorul și exteriorul țesuturilor, ce influențează echilibrul sistemelor. Potențialul redox este astfel un indice care caracterizează starea de oxido-reducere a țesutului în momentul analizării.

Principalele sisteme oxido-reducătoare existente în țesuturile vegetale sînt: fero-feri-porfirine, glutation-diglutation, acid ascorbic-acid dehidroascorbic, hidrochinonă-chinonă, acid fumaric — acid succinic, acid lactic-acid piruvic, alcool etilic-aldehidă acetică și altele.

Se pare că la plante un rol hotărîtor în dirijarea potențialului redox îl joacă combinațiile organice complexe cu fier [1].

Există corelații între potențialul redox și activitatea enzimelor, îndeosebi a proteazelor [2], [3], [4] și într-un sens mai larg între potențialul redox și anabolismul și catabolismul proteidelor [5], [6], [7]. Se pare că nu numai pentru proteaze, dar pentru toate enzimele există un potențial redox, respectiv un rH optim.

Determinarea potențialului redox în medii biologice se poate face prin două metode, și anume prin metoda directă potențiometrică sau prin metoda colorimetrică, ce face uz de substanțe organice în primul rînd — a căror structură și culoare se modifică reversibil sub acțiunea unui oxidant sau reducător.

A fost cercetat potențialul redox la diferite organe respectiv extracte sau preparate de origine animală și vegetală, cît și la culturi de microorganisme, făcîndu-se uz mai mult de metoda potențiometrică.

La plantele superioare s-au constatat deosebiri în valoarea potențialului redox în cazul diferitelor părți ale plantei, cît și variații în funcție de dezvoltare, nutriție și diferiți factori externi. Cercetări mai ample au fost efectuate la tuberculele de cartofi, unde s-au mai înregistrat deosebiri la diferitele soiuri și variații în funcție de condițiile de depozitare și de starea sanitară a tuberculelor [8], [9], [10], [11], [12], [13], [14].

Au fost studiate de asemenea corelațiile între potențialul redox și unele procese fiziologice, ca respirația în cazul tuberculelor de cartofi [15], fixarea azotului elementar în nodozități la soia [16], coacerea boabelor de struguri [17] și altele.

În cadrul cercetărilor noastre asupra caracterelor biochimice speciale ale porumbului ne-am propus să studiem potențialul redox al boabelor de porumb, pentru a vedea în ce măsură el ar putea servi la diferențierea biochimică a diferitelor soiuri și hibrizi de porumb. Comunicăm în prezenta lucrare asupra metodei de determinare folosită, asupra diferențelor între valorile potențialului redox al cîtorva soiuri de porumb și asupra dinamicii potențialului redox în cursul păstrării boabelor.

Potențialul redox a fost determinat potențiometric în terciul apos preparat din boabe de porumb proaspăt măcinate.

În experiențe preliminare s-a stabilit că determinările potențialului redox, executate comparativ în prezență de aer și în atmosferă inertă, permit în ambele cazuri sesizarea unor diferențe de același sens între diferitele probe analizate. În prezență de aer s-a obținut în general o reproductibilitate mai bună a valorilor, îndeosebi la înregistrările executate la 1 oră după prepararea terciului. Tot prin experiențe preliminare, executate comparativ cu terciuri apoase în prezență de 0,1% timol și în absență de timol, s-a stabilit că timp de 7 ore după prepararea terciului nu intervin reacții fermentative care să influențeze valorile potențialului redox. Abia la determinări executate după 24 ore de la prepararea terciului s-au înregistrat diferențe mai accentuate între probele cu și fără timol, care cu scurgerea timpului devin din ce în ce mai mari. Un adaos de 0,1% timol este practic fără influență asupra potențialului redox și pH-ului terciului.

Din înregistrări executate din 15 în 15 min, după prepararea probelor s-a observat că în jur de 1, 7 și 24 ore modificările potențialului redox sînt mai lente.

Ținînd seama de toate aceste constatări și de faptul că valorile potențialului redox al unor sisteme diferite sînt valori relative, determinările au fost executate în prezența aerului, după 1, 7 și 24 ore de la pregătirea probei.

La diferitele probe cercetate s-au înregistrat numai variații mici de pH, cuprinse între 5,8 și 6,3. În acest caz s-a putut renunța la exprimarea rezultatelor sub formă de rH, cu atît mai mult cu cît în sistemul biologic complex studiat nu era cunoscută valoarea exactă a echivalentului în potențial redox corespunzător unei unități de pH, care să permită o exprimare exactă a rH-ului pe baza formulei lui Clark. De fapt, cu excepția mediilor microbiologice, în cercetările privind potențialul redox din medii

biologice, se renunță de multe ori la exprimarea rezultatelor sub formă de rH [8], [9], [10], [11], [12], [13], [14], [17].

Stabilind potențialul redox la boabele a 5 soiuri de porumb, *Galben timpuriu*, *Arieșan timpuriu*, *Portocaliu de Tg. Frumos* (semitardiv), *Dobrogean* (semitardiv) și *ICAR 54* (tardiv), s-a constatat în toate cazurile că potențialul redox scade prin păstrarea terciului timp de 24 ore, de la valori cuprinse între + 124 pînă la + 200 mV, la — 132 pînă la — 258 mV, după cum se vede din figura 1.

La determinările executate după 1 oră de la prepararea terciului s-au găsit la diferitele soiuri de porumb diferențe în potențialul redox, variind între + 124 la soiul *Portocaliu de Tg. Frumos* și + 200 mV la soiul *Dobrogean*, după cum este arătat în tabelă. Din valorile înscrise în această tabelă mai rezultă că potențialul redox crește prin păstrarea boabelor timp de un an, de exemplu în cazul soiului *Galben timpuriu* de la + 173 la + 351 mV după 1 oră de la prepararea terciului și de la + 97 la + 324 mV după 7 ore de la prepararea terciului.

Tabelă

Potențialul redox al semințelor de porumb

Soiul	Potențialul redox în mV după					
	1 oră, la data de			7 ore, la data de		
	6.III.1960	21.X.1960	2.III.1961	6.III.1960	21.X.1960	2.III.1961
Galben timpuriu	173	320	351	97	351	324
Arieșan timpuriu	160	319	369	28	310	335
Portocaliu de Tg. Frumos	124	240	348	34	138	334
Dobrogean	200	306	355	57	311	327
ICAR 54	190	324	349	69	344	321

Se mai constată că după păstrarea boabelor timp de 1 an diferențele între valorile potențialului redox la diferitele soiuri de porumb devin practic neglijabile, precum și că scăderile înregistrate la păstrarea terciului timp de 1—7 ore sînt mult mai mici decît cele constatate la determinările executate cu un an în urmă.

Cu toate că există diferențe în potențialul redox al boabelor diferitelor soiuri de porumb în primele luni după recoltare, nu a fost găsită o corelație între caracterele biologice ale soiurilor și potențialul redox.

Existența unor diferențe în potențialul redox la boabele diferitelor soiuri de porumb, sezisabile prin metodica expusă, justifică extinderea cercetărilor asupra hibrizilor de porumb în comparație cu liniile parentale. În această direcție vor fi continuate cercetările noastre.

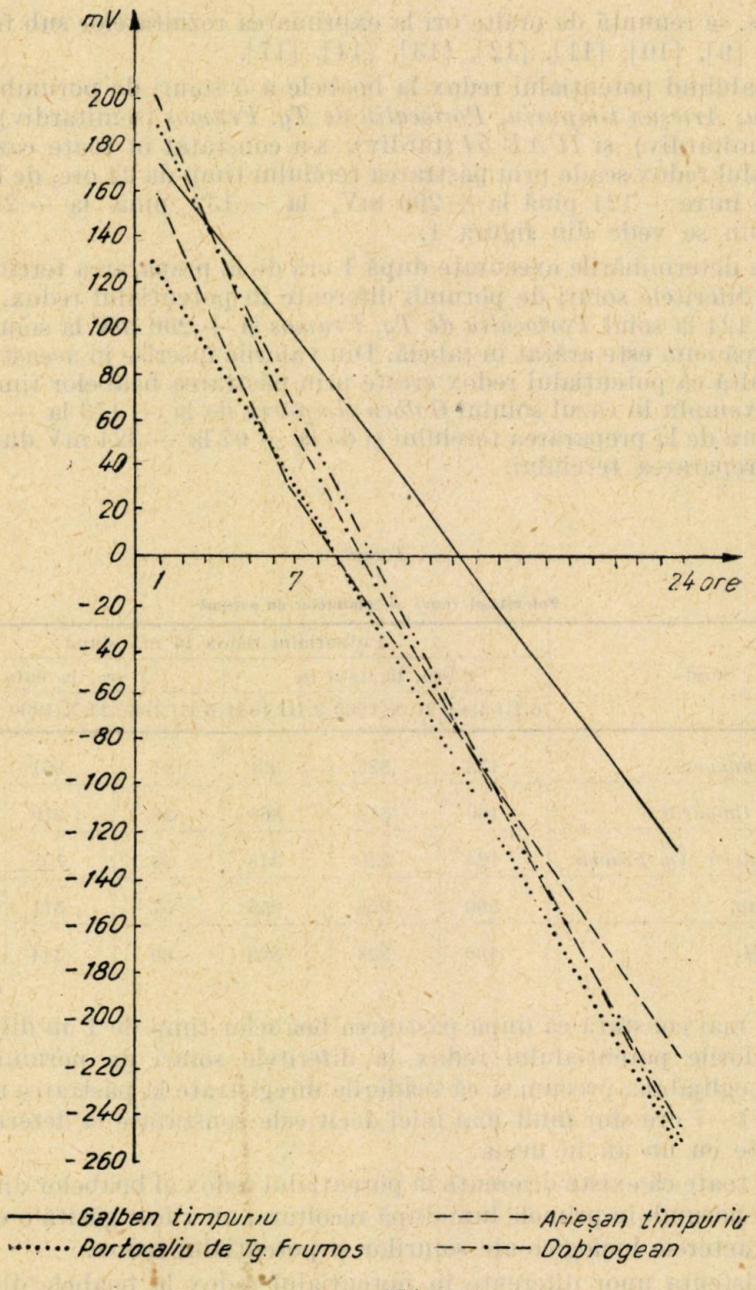


Fig. 1. — Variaţia potenţialului redox în decurs de 24 ore (6—7.III. 1960).

PARTEA EXPERIMENTALĂ

S-a lucrat cu soiuri pure de porumb, obținute de la stațiunea I.C.A.R. din Cluj, recolta 1959.

Pentru determinarea potențialului redox s-a făcut uz de electrod de platină neplatinat, electrod de referință de calomel și potențiometru cu tuburi electronice. Pentru stabilirea pH-ului s-a folosit electrod de sticlă.

Probele în care s-a măsurat potențialul redox s-au preparat prin agitarea a 5 g făină proaspăt măcinată cu 10 ml apă distilată liberă de CO_2. Operațiile de pregătire a probelor s-au executat în timpul cel mai scurt posibil.

Măsurătorile s-au efectuat la temperatură constantă (20°C), în vase de sticlă, închise. Prima înregistrare a valorilor potențialului redox s-a făcut la 1 oră după prepararea terciului, interval de timp necesar adaptării electrodului. Tot în vederea adaptării, introducerea electrodului în terci s-a făcut și la măsurătorile executate după 7 și 24 ore cu 1 oră înainte de efectuarea înregistrării.

În perioada de adaptare are loc în general o scădere a potențialului redox. Valori reproductibile se obțin după 1 oră.

În intervalul de timp dintre înregistrări probele au fost ținute în vase de sticlă închise.

Boabele de porumb au fost păstrate de la un an la altul în condiții obișnuite, la temperatura camerei.

Determinările de potențial redox s-au executat la 6—7.III. 1960, 21—22.X.1961 și 2—3.III.1961.

Prezentată la redacție la 12 februarie 1962

Catedra de chimie organică și biologică,
Institutul agronomic „Dr. Petru Groza",
Cluj

ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИАЛЬНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КУКУРУЗЫ. II. О РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛЕ ЗЕРЕН КУКУРУЗЫ

РЕЗЮМЕ

В работе определялся редокс-потенциал пяти сортов кукурузы урожая 1959 г.

Применялся потенциометрический метод; исследования проводились на водянистой кашице, полученной из свежесмолотых зерен.

Опыты, выполненные через час после приготовления кашицы, выявили разницу в значениях редокс-потенциала различных сортов от + 124 до + 200 мв.

Как правило, редокс-потенциал понижается при хранении кашицы в течение 24 часов. При хранении зерен в течение года редокс-

потенциал увеличивается, но разница в его значениях для различных сортов уменьшается.

Не было найдено связи между редокс-потенциалом и какой-либо биологической характеристикой сортов кукурузы.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Изменение редокс-потенциала в течение 24 часов (6—7.III.1950).

RECHERCHES SUR LES CARACTÈRES BIOCHIMIQUES SPÉCIAUX DU MAÏS

II. LE POTENTIEL RÉDOX DES GRAINES DE MAÏS

RÉSUMÉ

On a déterminé le potentiel rédox des graines de 5 variétés de maïs de la récolte 1959, en employant la méthode potentiométrique sur un broyat aqueux de graines fraîchement moulues.

Dans les déterminations exécutées une heure après la préparation du broyat on a constaté des différences allant de + 124 à + 200 mV entre le potentiel rédox des différentes variétés.

Le potentiel rédox diminue généralement par la conservation du broyat durant 24 heures. Par la conservation des graines pendant une année le potentiel rédox s'accroît, mais les différences entre les diverses variétés diminuent.

On n'a pu trouver aucune corrélation entre le potentiel rédox et l'un des caractères biologiques des variétés.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Variation du potentiel rédox pendant 24 heures (6—7.III.1960).

BIBLIOGRAFIE

1. G. Rummeni, Wiss. Z. Univ. Jena **4**, 611 (1954—55).
2. A. V. Blagovescenski, I. I. Korman, Biochem. Z., **270**, 341 (1934).
3. P. Karrer, W. Straus, C. R. Lab. Carlsberg, **22**, 255 (1938).
4. W. Kocholaty, L. E. Krejci, Arch. Biochem. **18**, 1 (1948).
5. K. Mothes, Flora, **28**, 58 (1933); Planta, **19**, 177 (1933).
6. A. Fischer, Naturwiss., **30**, 665 (1942).
7. I. D. Frantz, P. C. Zamecnik, J. W. Reese, M. L. Stephenson, J. Biol. Chem., **174**, 773 (1948).

8. H. WARTENBERG, A. HEY. O. URHAN, Arb. Biol. Reichsanst., **21**, 331 (1935).
9. И. Л. РАБОТНОВА, Микробиология, **5**, 2 (1936).
10. N. KRASINKII, Protopl., **25**, 1 (1936).
11. В. И. УСПЕНСКАЯ, Биологический Журнал, **5**, 1 (1936).
12. H. FRIEDRICH, Phytop. Z., **6**, 10 (1937).
13. В. И. УСПЕНСКАЯ, Микробиология, **8**, 8 (1939).
14. G. FRIEDRICHS, Ang. Bot., **21**, 374 (1939).
15. H. FRIEDRICH, Ang. Bot., **21**, 361 (1939).
16. H. EBERTOVÁ, Nature (London), **184**, 1046 (1959).
17. G. RUMMENI, Ber. Dtsch. Bor. Ges., **73**, 83 (1959).

TRANSFORMAREA ZEAXANTINEI ÎN ESCHSCHOLTZXANTINĂ ȘI MUTATOXANTINĂ SUB ACȚIUNEA TETRAACETATULUI DE PLUMB

DE

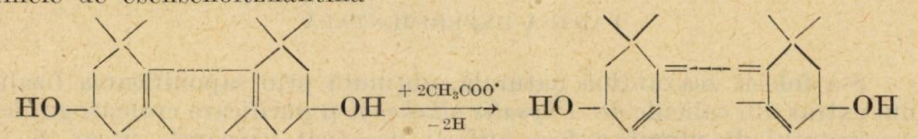
C. BODEA și V. TĂMAȘ

Printre carotinoidele întîlnite mai rar sau în cantitate mică în regnul vegetal și animal se găsesc compuși oxigenați cum sînt mutatoxantina, eschscholtzxantina și astaxantina, care pot fi considerați ca derivînd sau ca fiind înrudiți cu xantofila, zeaxantină larg răspîndită în regnul vegetal. Prepararea prin sinteză parțială a acestor carotinoide plecînd de la zeaxantină mai ușor accesibilă, ar ușura pe de o parte studiul proprietăților lor, iar pe de altă parte ar putea contribui la elucidarea mecanismului lor de formare *in vivo*.

În lucrări anterioare [1], [2] s-a arătat că prin acțiunea tetraacetatului de plumb are loc o introducere a grupărilor acetoxi în pozițiile 4 și 4′ din inelele iononice ale β-carotinei, ceea ce duce, după saponificare, la formarea izocriptoxantinei și izozeaxantinei. Printre produșii secundari ai reacției au fost găsiți 5,8-epoxizi rezultați din transformarea produsului de adiție a ionului CH_3COO^+ la dubla legătură din inelul ononic.

În lucrarea de față a fost cercetată acțiunea tetraacetatului de plumb asupra zeaxantinei, pentru a se vedea dacă prezența grupărilor hidroxilice în pozițiile 3 și 3′ permite introducerea grupărilor acetoxi în pozițiile 4 și 4′. În acest caz s-ar obține după saponificare, un tetrahidroxiderivat, care ar trece probabil, prin autoxidare, în astaxantină.

Rezultatele obținute în diferite condiții experimentale au arătat însă că nu are loc o introducere a grupărilor acetoxi în pozițiile 4 respectiv 4′. Reacția decurge în sensul extragerii de hidrogen din aceste poziții de către radicalii $CH_3COO^{\cdot}$, cu transformarea zeaxantinei în 3,3′-dihidroxiretrodehidrocarotină (retrodehidrozeaxantină), cunoscută de obicei sub numele de eschscholtzxantină



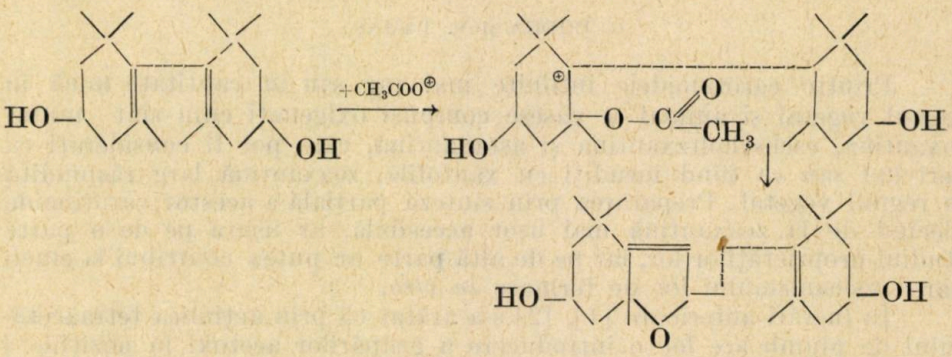
Zeaxantină — Eschscholtzxantină

Grupările hidroxilice din 3 şi 3′ împiedică deci intrarea grupărilor acetoxi în poziţiile 4 şi 4′.

Randamentul cu care se obţine în această reacţie eschscholtzxantina este, ca în toate reacţiile cu tetraacetat de plumb, mult influenţat de condiţiile de lucru, îndeosebi de activitatea reactivului. Randamentul maxim ce a putut fi atins a fost de 15%.

Eschscholtzxantina, găsită mai întîi în florile de *Eschscholtzia californica* [3], a fost obţinută cu randament de aproximativ 5% prin sinteză parţială, sub acţiunea bromsuccinimidei asupra fizalienului (dipalmitatului de zeaxantină) [4].

În reacţia dintre tetraacetatul de plumb şi zeaxantină apare alături de eschscholtzxantină şi 5,8-epoxidul de zeaxantină, numit mutatoxantină. Acest derivat se formează în urma adiţiei ionului CH_3COO^+ la dubla legătură a unuia din inelele ononice, urmată de o transformare al cărei mecanism a fost arătat într-una din lucrările noastre anterioare [2]



Zeaxantină Mutatoxantină

Randamentul cu care se obţine din această reacţie mutatoxantina este de 1—2%.

Dacă se acţionează cu tetraacetat de plumb asupra fizalienului sau asupra diacetatului de zeaxantină, nu are loc extragerea de hidrogen din poziţiile 4 şi 4′, ci numai formarea de 5,8-epoxizi şi de produşi de degradare neidentificaţi.

Constatăm, în concluzie, că metoda cu acetatul de plumb permite obţinerea prin sinteză parţială a eschscholtzxantinei şi, ca produs secundar, a mutatoxantinei cu randament sensibil îmbunătăţit faţă de alte metode cunoscute, ceea ce va permite studierea unor proprietăţi încă insuficient cunoscute a acestor carotinoide, care sînt greu de obţinut în cantităţi suficiente prin extragere din organe vegetale.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

S-a folosit zeaxantină naturală, obţinută prin saponificarea fizalienului extras din caliciile de *Physalis alkekengi* şi purificare cromatografică. Tetraacetatul de plumb a fost utilizat proaspăt preparat, uscat şi fin

divizat. Întrucît reactivitatea tetraacetatului de plumb este diferită la fiecare șarjă, s-a stabilit mai întîi, prin tatonare, timpul optim de reacție.

La 0,459 g zeaxantină, dizolvată în 100 ml cloroform proaspăt distilat și uscat, se adaugă dintr-o dată 0,424 g $Pb(CH_3COO)_4$ și se agită timp de 2 min. La introducerea tetraacetatului soluția își deschide culoarea, care apoi se intensifică înspre roșu ; în acest moment se adaugă un amestec de 20 ml benzen și 400 ml neofalină (p.f. 60—70°C), ceea ce determină precipitarea tetraacetatului și a acetatului de plumb. Se filtrează, iar soluția se cromatografiază pe amestec adsorbant MgO-nisip fin, 1 :2 (5,5 × 40 cm). Se developează cu un amestec de neofalină-acetonă, în care concentrația în acetonă s-a mărit pînă la 10%.

Cromatograma se prezintă precum urmează (de sus în jos) :

	35 mm	ocru	produși de degradare
	2 mm	incolor	
A	35 mm	portocaliu	eschscholtzxantină trans-totală
	2 mm	incolor	
B	10 mm	portocaliu	eschscholtzxantină izomer cis
	3 mm	incolor	
C	30 mm	galben	mutatoxantină
	80 mm	portocaliu	zeaxantină

Zona *A* se eluează cu un amestec de neofalină-benzen-etanol (8 :2 :1), se spală de mai multe ori cu apă pentru îndepărtarea alcoolului, iar soluția pigmentului se usucă pe Na_2SO_4 și se recromatografiază. Se developează cu amestec de neofalină-acetonă, în care concentrația în acetonă este mărită pînă la 12%. Se eluează cu amestec de eter etilic-benzen-etanol (7 :2 :1). Se spală cu apă, se usucă și se evaporă solventul la sec. Reziduul se reia cu benzen și se precipită cu metanol. Prin recristalizare din benzen-metanol se obțin cristale violete. Randamentul este de pînă la 15%.

Identificarea pigmentului din zona *A* ca fiind eschscholtzxantină s-a făcut prin spectrul de absorbție în eter de petrol 510—490, 480—460, 450—435 mμ, prin proba de repartiție în amestec de eter de petrol-metanol 95%, în care se comportă 100% hipofazic. Soluția cloroformică a pigmentului, tratată cu cloroform ce conține HCl, se închide la culoare datorită eliminării de apă și transformării în anhidro-eschscholtzxantină. Aceasta a fost identificată prin spectrul de absorbție 535—525, 505—485 mμ în eter de petrol și prin comportarea epifazică în amestec de eter de petrol-metanol 95%.

Zona *B* se prelucrează ca și zona *A*. Spectrul de absorbție în eter de petrol 505—490, 480—460, 450—430 mμ și repartiția 100% hipofazică în amestec de eter de petrol-metanol 95% dovedesc că pigmentul este un izomer cis al eschscholtzxantinei. La tratarea soluției cloroformice cu cloroform ce conține HCl, acest pigment se transformă, ca și pigmentul din zona *A*, în anhidro-eschscholtzxantină. Prin fierberea pigmentului din zona *B* în soluție benzenică, timp de 30 min, el trece parțial în eschscholtzxantină trans-totală.

Zona *C* se purifică prin recromatografiere, se eluează cu amestecul utilizat la eluarea pigmentului din zona *A*, se spală şi se evaporă la sec. Reziduul se reia cu benzen. Prin adăugare de metanol pigmentul precipită sub formă de pulbere galbenă-portocalie. Randamentul este de pînă la 2%.

Acest pigment s-a dovedit a fi mutatoxantină (5,8-epoxidul zeaxantinei), cu spectrul de absorbţie în eter de petrol 460—445 mμ, repartiţie hipofazică de peste 80% în amestec de eter de petrol-metanol 95%.

Tratînd soluţia pigmentului în eter etilic cu HCl concentrat, se obţine o coloraţie intens albastră, caracteristică pentru epoxizi.

În cromatograma de amestec cu mutatoxantină naturală, izolată din caliciile de *Physalis alkekengi*, nu se obţine o separare la developare cu amestec de neofalină-acetonă.

Prezentată la redacţie la 12 februarie 1962

Catedra de chimie organică şi biologică,
Institutul agronomic „Dr. P. Groza",
Cluj

ПРЕВРАЩЕНИЕ ЗЕАКСАНТИНА В ЭШШОЛЬЦКСАНТИН И МУТАТОКСАНТИН ПОД ВЛИЯНИЕМ ТЕТРАЦЕТАТА СВИНЦА

РЕЗЮМЕ

Выделенный из чашечек Physalis alkekengi зеаксантин обрабатывали в хролоформном растворе тетрацетатом свинца, а продукты реакции разделяли хроматографическим методом. В результате экстрагирования водорода в положениях 4 и 4′ под действием радикалов $CH_3COO\cdot$ главным продуктом реакции был эшшольцксантин (ретродегидрозеаксантин) с выходом до 15%. Наличие групп OH в положениях 3 и 3′ не позволяет группам ацетокси связываться в положения 4 и 4′. Побочным продуктом реакции является мутатоксантин (5,8-эпоксизеаксантин); выход его не превышает 2%.

TRANSFORMATION DE LA ZÉAXANTHINE EN ESCHSCHOLTZ-XANTHINE ET MUTATO-XANTHINE PAR L'ACTION DU TÉTRAACÉTATE DE PLOMB

RÉSUMÉ

La zéaxanthine isolée des calices du coqueret (*Physalis alkekengi*) a été traitée en solution chloroformique au tétraacétate de plomb et les produits de la réaction ont été séparés chromatographiquement. À la

suite de l'élimination de l'hydrogène des positions 4 et 4′ par les radicaux $CH_3COO^{\cdot}$ on a obtenue comme principal produit de réaction l'eschscholtz-xanthine (la rétro-déhydro-zéaxanthine), dans un rendement allant jusqu'à 15%. Les groupes hydroxyle des positions 3 et 3′ empêchent le greffage des groupes acétoxy- dans les positions 4 et 4′. Comme produit secondaire de la réaction on a obtenu, avec un rendement allant jusqu'à 2%, la mutato-xanthine (5,8 — époxyde de zéaxanthine).

BIBLIOGRAFIE

1. C. Bodea, M. Florescu, Studii și cercetări de biochimie, **III**, *1*, 13 (1960).
2. C. Bodea, E. Nicoară, T. Salontai, Liebigs Ann. Chem., **648**, 147 (1961).
3. P. Karrer, E. Leumann, Helv. Chim. Acta, **34**, 445 (1951)
4. R. Entschel, P. Karrer, Helv. Chim. Acta, **40**, 1809 (1957).

EFECTUL RADIAȚIILOR ASUPRA PROTEINELOR

VI. INFLUENȚA RADIAȚIILOR γ ASUPRA PROTEINELOR DIN CRISTALIN

DE

L. M. BURUIANĂ și V. PAVLU

Printre mijloacele întrebuințate la analiza calitativă a proteinelor, metoda polarografică capătă din ce în ce mai multă importanță. Cu ajutorul acestei metode s-a reușit să se pună în evidență unele proprietăți puțin cunoscute ale proteinelor.

Astfel, s-a observat că proteinele din plasma seminală a unor specii de animale au activitate polarografică diferită [3], ceea ce este în strînsă legătură cu natura glicoproteinelor și cu modul de legare a grupărilor glucidice [8]. Diferențe remarcabile s-au observat de asemenea între proteinele native ale grîului și porumbului [5]. Metoda polarografică a pus în evidență existența unui fenomen de resinteză în cursul hidrolizei caseinei, sub acțiunea unor proteaze [4], [6] etc.

Se pot de asemenea stabili unele indicații de structură prin complexarea anumitor atomi din molecula proteică cu metalele grele, în special cu ionii de cobalt.

Datorită chelatării grupărilor specifice ale proteinelor (amină, imidazol, guanidină, carboxil etc.), acestea devin polarografic active (Brdiçka). Electrofilia complecșilor chelatici se mărește, ceea ce ușurează eliberarea protonilor. Aceste grupări se pot împărți în două categorii distincte în cazul majorității proteinelor și sînt caracterizate polarografic prin două maxime, denumite trepte proteice. Cele cu electrofilia mai mare sînt numite grupări prototropice de ordinul I (grupări P_1), iar cele cu electrofilia mai mică sînt numite grupări prototropice de ordinul II (grupări P_2). Evoluția hidrogenului la electrodul picător se face mai ușor în primul caz și mai greu într-al doilea caz. Din punct de vedere polarografic, grupările de ordinul I sînt responsabile de prima treaptă, iar cele de ordinul II, de a doua treaptă.

Puterea de chelatare totală a unei substanțe proteice este corelată cu cantitatea necesară pentru a coborî la jumătate maximul cobaltului din soluția suport. Inversul acestei cantități se numește putere suprimantă (P_s). P_s este un parametru important în analiza polarografică a protei-

nelor, deoarece poate să dea informaţii cu privire la modificările greutăţii moleculare şi ale tensiunii superficiale la electrodul picător. Natura chimică a grupărilor complexante şi a ionului metalic implicat poate de asemenea să influenţeze puterea suprimantă. Precizînd condiţiile de lucru pentru o anumită proteină, variaţia puterii suprimante poate sluji la urmărirea modificărilor pe care le suferă aceasta.

Raportul cantitativ între grupările P_1 şi P_2 poate fi apreciat, într-o anumită limită, printr-un parametru denumit punct de inversie (P_I). El reprezintă concentraţia în proteină a soluţiei, pentru care valoarea curentului de difuziune corespunzătoare primei trepte este egală cu aceea corespunzătoare celei de a doua trepte. Semnificaţia acestui parametru este încă obscură, însă este sigur că procesele de solvatare joacă un rol important în legătură cu el.

Aceste precizări sînt necesare pentru interpretarea rezultatelor obţinute de noi.

Într-o altă publicaţie [7] s-a arătat că metoda polarografică se poate aplica cu succes la studiul efectului radiaţiilor γ asupra soluţiilor proteice. În general, se admite că proteinele nu sînt influenţate de iradierile slabe. În cercetările amintite mai sus faptul a fost infirmat. Rezultate similare au fost obţinute şi de A. P. Vişniakov [12], [13].

Prezentăm în cele ce urmează datele obţinute cu privire la efectul radiaţiilor ionizante asupra proteinelor separate din cristalinul bovideelor.

MATERIAL ŞI METODA DE LUCRU

Se admite că în cristalin se găsesc 3 varietăţi principale de proteine solubile, denumite cristaline α, β şi γ, şi o fracţiune insolubilă, albuminoidul. Analiza imunoforetică relevă însă un număr de 11 fracţiuni [9]. W. F. Bon [2] este de părere că mulţimea acestor fracţiuni nu corespunde realităţii, ci uşurinţei cu care lanţurile polipeptidice din constituţia proteinelor cristaline se pot desface şi agrega în cursul analizei şi că, de fapt, există numai 3 proteine solubile distincte.

Proteinele cristaline cercetate de noi au fost izolate din cristalinul de bovidee în modul următor : se recoltau la abator, imediat după sacrificare, ochii cu totul şi se transportau în gheaţă la laborator, unde se deschideau prin camera posterioară, evacuîndu-se umoarea vitroasă şi cristalinul. Acesta se ştergea cu tifon steril şi apoi un număr de circa 20 de bucăţi, se triturau la mojar cu pulbere de cuarţ şi 3 ml soluţie de extracţie de fiecare cristalin. Se lăsa 2 ore la gheaţă şi se centrifuga 30 min, cu viteza de 5 000 rot/min. Din supranatant se izolau 3 fracţiuni, prin precipitare fracţionată, conform tehnicii lui N. Orekhovici şi K. F. Firfarova [10]. După dializă şi îndepărtarea sulfatului de amoniu, fracţiunile erau analizate polarografic, înainte şi după iradiere cu o sursă de ^{60}Co, 0,03 r/h. Se determina de fiecare dată conţinutul în proteină cu metoda Kjeldahl. Înregistrările polarografice au fost făcute cu polarograful Heyrovsky model V 301, prevăzut cu adaptorul V. Pavlu şi L. Schechter [11], în soluţie suport Brdiçka Co^{III}.

REZULTATE

Deoarece comportarea la iradiere a cristalinelor depinde de lichidul de extracție, vom prezenta două serii de rezultate.

Cristaline extrase cu ajutorul apei distilate

1. Cristalina α H_2O. Polarogramele obținute sînt prezentate în figura 1.

Se observă că efectul iradierii se manifestă prin creșterea electrofiliei grupărilor prototropice, ceea ce ușurează eliberarea protonilor. Treptele catalitice cresc. Puterea suprimantă crește, ceea ce ar putea fi explicat prin formarea unor agregate moleculare. După un repaos de 24 ore, valoarea P_s revine la normal. Polarograma însă rămîne neschimbată, fapt care se explică prin aceea că iradierea produce o deformare a structurii macromoleculare, însoțită de alt aranjament al electronilor de valență.

2. Cristalina β H_2O. Din polarograma din figura 2 se observă că iradierea modifică foarte puțin electrofilia grupărilor prototropice și mai ales a grupărilor P_2. Puterea suprimantă crește, pentru a reveni apoi la normal.

3. Cristalina γ H_2O. Activitatea polarografică a acestei fracțiuni este mai ridicată decît a fracțiunilor precedente (fig. 3). Comportarea este asemănătoare cu a fracțiunii α H_2O.

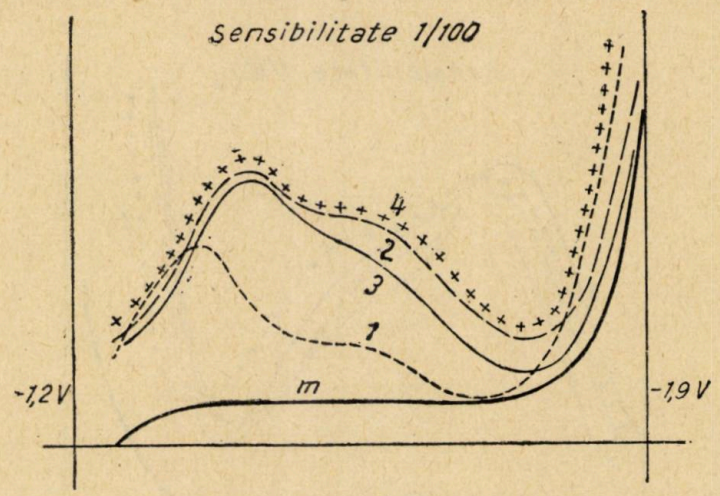


Fig. 1. — Polarograma cristalinei α H_2O.

m — polarograma martor, soluția Brdicka Co^{3+}. *1.* — polarograma soluției de cristalină înainte de iradiere. Concentrația în proteină: 6,95 mg%; *2* — după 10 min de iradiere; *3* — după 60 min de iradiere; *4* — după 24 ore de repaos de la iradiere.

Spre deosebire de fracțiunile α H_2O și β H_2O, fracțiunea aceasta suferă prin iradiere o micșorare a puterii suprimante, deci o simplificare a edificiului macromolecular. Avînd cea mai mică greutate moleculară dintre toate, se poate afirma că prin iradiere cu radiații γ de tăria celor

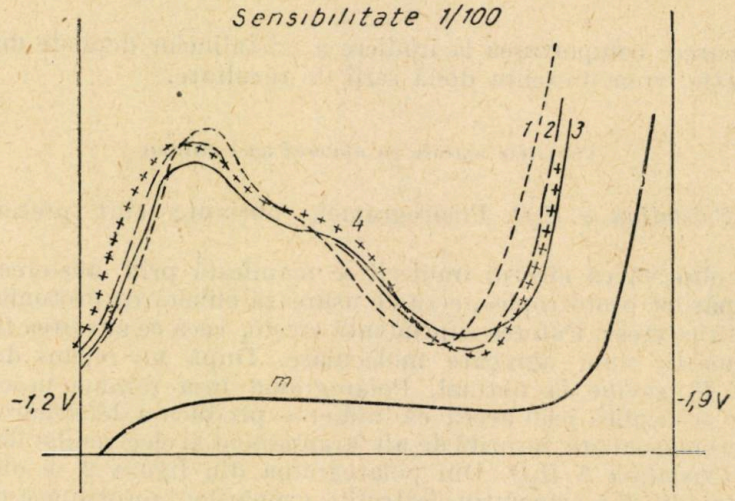


Fig. 2. — Polarograma cristalinei β H_2O.

m — polarograma martor. *1* — soluția de cristalină, înainte de iradiere. Concentrația în proteină : 3,1 mg% ; *2* — după 10 min de iradiere ; *3* — după 60 min de iradiere ; *4* — după 24 ore de repaos de la iradiere.

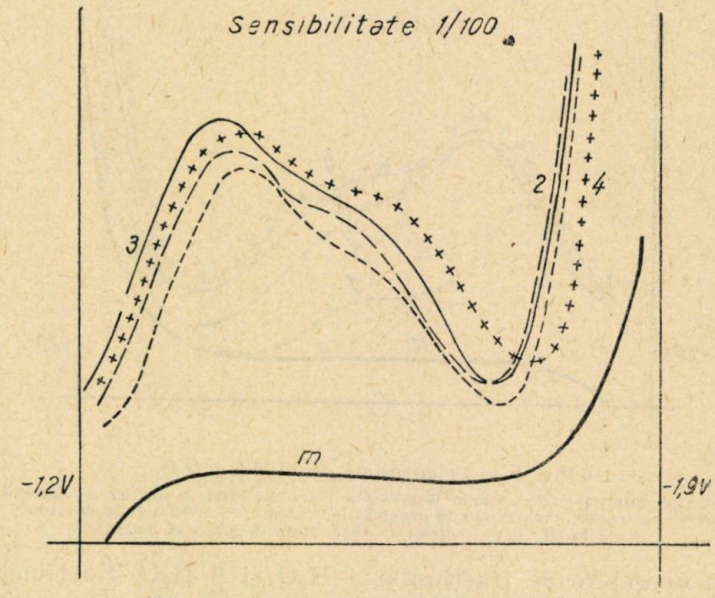


Fig. 3. — Polarograma cristalinei γ H_2O.

m — polarograma martor; *1* — polarograma soluției de cristalină înainte de iradiere. Concentrația în proteină : 6,5 mg% ; *2* — după 10 min de iradiere ; *3* — după 60 min de iradiere ; *4* — după 24 ore de repaos de la iradiere.

utilizate proteinele cu greutatea moleculară mai mare suferă un proces de asociere, iar proteinele cu greutate moleculară mai mică suferă un proces de simplificare.

Observațiile cu privire la puterea suprimantă sînt redate în tabela 1.

Tabela 1

Variația puterii suprimante (P_s) a cristalinelor extrase cu apă distilată

Cristalina	Înainte de iradiere	După 10 min de iradiere	După 60 min de iradiere	După 24 ore repaos	Efect final
α H_2O	4714	5634	5764	4714	nul
β H_2O	5333	9216	8064	5333	nul
γ H_2O	10152	9523	13333	6666	scădere

Din tabelă se observă că cristalina γ H_2O arată cea mai mare, iar cristalina α H_2O, cea mai mică putere de chelatare. Efectul iradierii depinde de solubilitatea lor. Cristalinele cele mai solubile și cu greutatea moleculară mai mică suferă o simplificare a edificiului macromolecular, pe cînd cele mai puțin solubile și cu greutatea moleculară mai mare, o asociere a macromoleculelor. Fenomenul de asociere este în general reversibil. Din aspectul polarogramelor rezultă că se produc totuși și unele modificări ireversibile de structură, în special în cazul cristalinelor α și β. Ele constau dintr-o deformare a structurii electronice a atomilor care intră în compoziția grupărilor prototropice și o modificare a electrofiliei lor.

Sensibilitatea foarte mare a cristalinei α la diferiți agenți fizici a fost deja semnalată. W. F. Bon [1] observă, de pildă, că precipitarea la pH = 5 și redizolvarea la pH = 7,8 modifică constanta de sedimentare, datorită faptului că varietatea globulară α_A se transformă în varietatea fibroasă-aciculară α_B. Rezultatele polarografice obținute demonstrează că radiațiile ionizante slabe deformează de asemenea macrostructura acestei proteine.

Cristaline extrase cu o soluție salină (0,9% clorură de sodiu)

Sensibilitatea structurală a cristalinelor ne-a sugerat ideea de a cerceta influența soluției extractive asupra comportării polarografice a cristalinelor înainte și după iradiere. În acest scop, în locul apei distilate am întrebuințat o soluție de NaCl 0,9%.

Fracționarea soluției după extracția cristalinului s-a făcut tot cu ajutorul sulfatului de amoniu, s-a dializat însă contra soluției de NaCl 0,9% și nu contra apei distilate.

4. Cristalina α NaCl. Activitatea polarografică este reprezentată în figura 4.

Se constată că este mult mai mică în acest caz decît în cazul fracțiunii corespunzătoare α H_2O. Aceasta demonstrează că în cazul extrac-

ţiei cu soluţia de clorură de sodiu grupările prototropice sînt modificate. Deoarece electrofilia lor a crescut, înseamnă că soluţia salină produce o

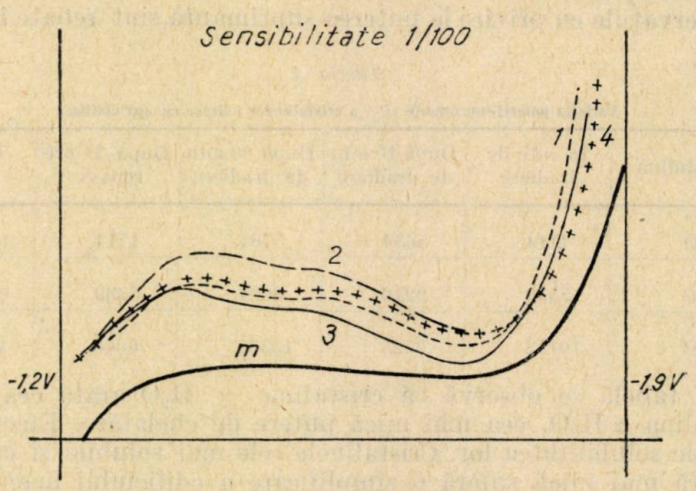


Fig. 4. — Polarograma cristalinei α NaCl.

m — polarograma martor. *1* — polarograma soluţiei de cristalină înainte de iradiere. Concentraţia în proteină : 33,3 mg% ; *2* — după 10 min de iradiere ; *3* — după 60 min de iradiere ; *4* — după 24 ore de repaos de la iradiere.

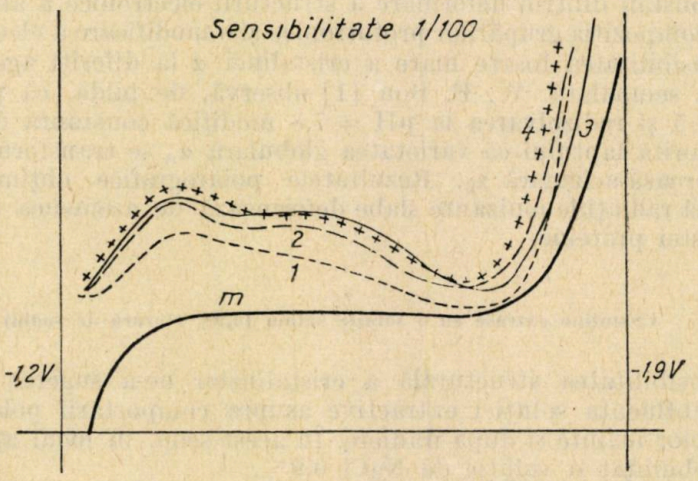


Fig. 5. — Polarograma cristalinei β NaCl.

m — polarograma martor. *1* — polarograma soluţiei de cristalină înainte de iradiere. Concentraţia în proteină : 29,7 mg% ; *2* — după 10 min de iradiere ; *3* — după 60 min de iradiere ; *4* — după 24 ore de repaos de la iradiere.

încreţire a lanţurilor polipeptidice, care protejează grupările prototropice. Apa distilată are un efect invers, favorizînd desfacerea lanţurilor polipeptidice (întinderea lor). Efectul iradierii este mai redus în acest caz,

ceea ce se vede din modificarea minimă a polarogramelor. Puterea suprimantă scade, spre deosebire de ceea ce se petrece în cazul fracțiunii αH_2O.

5. Cristalina β NaCl. Comportarea acestei fracțiuni este redată în figura 5.

Și în acest caz se constată o scădere a activității polarografice și o rezistență crescută la iradiere.

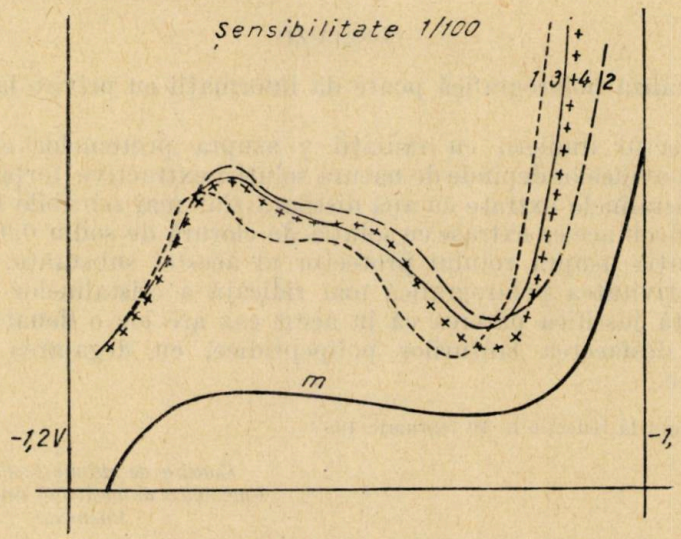


Fig. 6. — Polarograma cristalinei γ NaCl.
m — polarograma martor; *1* — polarograma soluției de cristalină înainte de iradiere. Concentrația în proteină: 18,20 mg%; *2* — după 10 min de iradiere; *3* — după 60 min de iradiere; *4* — după 24 ore de repaos de la iradiere.

Procesul de asociere este mult mai activ, puterea suprimantă crescînd.

6. Cristalina γ NaCl. Deși mai redusă decît în cazul cristalinei γ H_2O, activitatea acestei fracțiuni este mai mare decît a fracțiunilor α NaCl și β NaCl (fig. 6).

Efectul iradierii este redus și în acest caz. Puterea suprimantă se mărește, după 24 de ore revenind la normal. Pentru a se putea aprecia efectul iradierii asupra puterii suprimante a fracțiunilor extrase cu soluția salină, prezentăm mai jos tabela rezumativă 2.

Tabela 2

Variația puterii suprimante (P_s) a cristalinelor extrase cu soluție de clorură de sodiu 0,9 %

Cristalina	Înainte de iradiere	După 10 min de iradiere	După 60 min de iradiere	După 24 ore repaus	Efect final
α NaCl	6192	4545	6060	4867	scădere
β NaCl	5390	9090	7070	7070	creștere
γ NaCl	7300	10000	11111	7300	nul

Din comparaţia rezultatelor obţinute în cazul cristalinelor extrase cu ajutorul apei distilate şi a unei soluţii saline rezultă că extracţia cu apă distilată a cristalinelor modifică structura acestora, ele devenind mai sensibile la efectul radiaţiilor ionizante.

Clorura de sodiu, din contră, produce schimbări structurale ale cristalinelor, care le fac mai rezistente la acţiunea radiaţiilor γ.

CONCLUZII

1. Analiza polarografică poate da informaţii cu privire la structura proteinelor.
2. Efectul iradierii cu radiaţii γ asupra proteinelor extrase din cristalinul bovideelor depinde de natura soluţiei extractive (forţa lor ionică).
3. Cristalinele extrase cu apă distilată sînt mai sensibile la acţiunea radiaţiilor decît acelea extrase cu soluţia de clorură de sodiu 0,9%, ceea ce atrage atenţia asupra rolului protector al acestei substanţe.
4. Activitatea polarografică mai ridicată a cristalinelor extrase cu apă distilată justifică părerea că în acest caz are loc o denaturare, care constă în desfacerea lanţurilor polipeptidice, cu degajarea grupărilor prototropice.

Prezentată la redacţie la 19 februarie 1962

Catedra de chimie biologică,
Facultatea de medicină veterinară,
Bucureşti

ВЛИЯНИЕ ИЗЛУЧЕНИЙ НА БЕЛКИ

VI. ВЛИЯНИЕ γ-ЛУЧЕЙ НА БЕЛКИ ХРУСТАЛИКА

РЕЗЮМЕ

В работе обсуждаются возможные соотношения между строением белков и их полярографической активностью.

Из полученных данных явствует, что полярографический метод подходит для изучения некоторых свойств белков.

При помощи этого метода рассматривалось поведение белков, извлеченных из хрусталика крупного рогатого скота (хрусталики α, β и γ) по отношению к действию γ-лучей слабой интенсивности (0,03 r/h).

Было констатировано, что влияние излучения зависит от раствора, которым производится экстрагирование.

Хрусталики, экстрагированные водой, бо́лее чувствительны к облучению, а экстрагированные физиологическим раствором (0,9% NaCl) — менее чувствительны.

Полярографический анализ показывает, что экстракция дистиллированной водой ведет к изменению белков хрусталика.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Полярограмма хрусталика αH_2O;
m — контрольная полярограмма, раствор Брдичка CO^{3+}.
Кривая 1. Полярограмма раствора хрусталика до излучения. Концентрация белка: 6,95 мг %.
Кривая 2. После 10-ти минутного излучения.
Кривая 3. После 60-ти минутного излучения.
Кривая 4. 24 часа после излучения.
Рис. 2. — Полярограмма хрусталика βH_2O;
m — контрольная полярограмма.
Кривая 1. Раствор хрусталика до излучения. Концентрация белка: 3,1 мг %.
Кривая 2. После 10-ти минутного излучения.
Кривая 3. После 60-ти минутного излучения.
Кривая 4. 24 часа после излучения.
Рис. 3. — Полярограмма хрусталика γH_2O;
m — Контрольная полярограмма.
Кривая 1. Полярограмма раствора хрусталика до излучения. Концентрация белка: 6,5 мг %.
Кривая 2. После 10-ти минутного излучения.
Кривая 3. После 60-ти минутного излучения.
Кривая 4. 24 часа после излучения.
Рис. 4. — Полярограмма хрусталика α NaCl;
m — контрольная полярограмма.
Кривая 1. Полярограмма раствора хрусталика до излучения. Концентрация белка: 33,3 мг %.
Кривая 2. После 10-ти минутного излучения.
Кривая 3. После 60-ти минутного излучения.
Кривая 4. 24 часа после излучения.
Рис. 5. — Полярограмма хрусталика β NaCl;
m — контрольная полярограмма.
Кривая 1. Полярограмма раствора хрусталика до излучения. Концентрация белка: 29,7 мг %.
Кривая 2. После 10-ти минутного излучения.
Кривая 3. После 60-ти минутного излучения.
Кривая 4. 24 часа после излучения.
Рис. 6. — Полярограмма хрусталика γ NaCl;
m — контрольная полярограмма.
Кривая 1. Полярограмма раствора хрусталика до излучения. Концентрация белка: 18,20 мг %.
Кривая 2. После 10-ти минутного излучения.
Кривая 3. После 60-ти минутного излучения.
Кривая 4. 24 часа после излучения.

EFFET DES RADIATIONS SUR LES PROTÉINES

VI. INFLUENCE DES RAYONS γ SUR LES PROTÉINES DU CRISTALLIN

RÉSUMÉ

On discute les relations possibles entre la structure des protéines et leur activité polarographique. Il en résulte que la méthode polarographique est un moyen indiqué pour l'investigation de certaines propriétés des protéines.

On emploie cette méthode pour analyser le comportement des protéines extraites du cristallin de bovidés (les cristallines α, β et γ) à l'irradiation avec des rayons γ de faible intensité (0,03 r/h).

On constate que l'effet de l'irradiation dépend de la solution avec laquelle on effectue l'extraction. Les cristallines extraites à l'eau distillée sont plus sensibles à l'effet de l'irradiation, tandis que celles extraites à la solution physiologique (0,9% NaCl) se montrent moins sensibles.

On en conclut que l'extraction à l'eau distillée provoque une dénaturation des protéines du cristallin.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Polarogramme de la cristalline α H_2O.
m — Polarogramme témoin, solution Brdička CO^{3+}.
Courbe 1. Polarogramme de la solution de cristalline avant l'irradiation. Concentration en protéines : 6,95 mg%.
Courbe 2. Après 10 minutes d'irradiation.
Courbe 3. Après 60 minutes d'irradiation.
Courbe 4. Après 24 heures de repos après l'irradiation.
Fig. 2. — Polarogramme de la cristalline β H_2O.
m — Polarogramme témoin.
Courbe 1. — Polarogramme de la solution de cristalline avant l'irradiation. Concentration en protéines : 3,1 mg%.
Courbe 2. — Après 10 minutes d'irradiation.
Courbe 3. — Après 60 minutes d'irradiation.
Courbe 4. — Après 24 heures de repos après l'irradiation.
Fig. 3. — Polarogramme de la cristalline γ H_2O.
m — Polarogramme témoin.
Courbe 1. — Polarogramme de la solution de cristalline avant l'irradiation.
Concentration en protéines : 6,5 mg %.
Courbe 2. — Après 10 minutes d'irradiation.
Courbe 3. — Après 60 minutes d'irradiation.
Courbe 4. — Après 24 heures de repos après l'irradiation.
Fig. 4. — Polarogramme de la cristaline α NaCl.
m — Polarogramme témoin.
Courbe 1. — Polarogramme de la solution de cristalline avant l'irradiation.
Concentration en protéines : 33,3 mg %.
Courbe 2. — Après 10 minutes d'irradiation.
Courbe 3. — Après 60 minutes d'irradiation.
Courbe 4. — Après 24 heures de repos après l'irradiation.
Fig. 5. — Polarogramme de la cristalline β NaCl.
m — Polarogramme témoin.
Courbe 1. — Polarogramme de la solution de cristalline avant l'irradiation.
Concentration en protéines : 29,7 mg%.
Courbe 2. — Après 10 minutes d'irradiation.
Courbe 3. — Après 60 minutes d'irradiation.
Courbe 4. — Après 24 heures de repos après l'irradiation.
Fig. 6. — Polarogramme de la cristalline γ NaCl.
m — Polarogramme témoin.
Courbe 1. — Polarogramme de la solution de cristalline avant l'irradiation. Concentration en protéines : 18,20 mg %.
Courbe 2. — Après 10 minutes d'irradiation.
Courbe 3. — Après 60 minutes d'irradiation.
Courbe 4. — Après 24 heures de repos après l'irradiation.

BIBLIOGRAFIE

1. Bon W. F., *Physikalisch-chemische Untersuchungen eines Komplexen Eiweisses : das lösliche Eiweiss der Augenlinse, α-cristallin*, Experientia, **16**, *11*, 485 (1960).
2. Bon W. F., *Physico-chemical investigations on a complex protein : the soluble protein of the eye lens, α-cristallin*, J. of biol. Chem., **236**, *1*, 81 (1961).
3. Buruiana L. M., Pavlu V., *Le comportement polarographique du sperme*, Naturwiss, *22*, 589 (1957).
4. Buruiana L. M., Pavlu V., *Quelques résultats obtenus à l'aide de la méthode polarographique pendant la protéolyse de la caséine*. Naturwiss., *6*, 132 (1958).
5. Buruiana L. M., Pavlu V., *Quelques particularités des protéines de maïs révélés par l'analyse polarographique*. Naturwiss., *20*, 492 (1958).
6. Buruiana L. M., Pavlu V., *Sur le phénomène de „resynthèse" de la caséine pendant la trypsinolyse*. Naturwiss., *2*, 78 (1959).
7. Буруянэ, Л. М., Павлу В., *Полярографический анализ растворов белков подвергшихся действию ионизирующей радиации слабой интенсивности*, Биохимия, **25**, *4*, 593 (1960).
8. Buruiană L. M., Pavlu V., *Activitatea polarografică a filtratului sulfo-salicilic în cazul spermei. Comparație cu glucidograma*, în curs de publicare, 1962.
9. Manski W. J., Halbert S. P., Auerbach Th. P., *Immunochemical analysis of lens protein separation*. Arch. of Biochem. & Biophys., **92**, 512 (1961).
10. Orekhovici N. N., Firfarova K. F.. *Des protéines du cristallin de l'œil*. Bull. Soc. Chim. Biol., **41**, *2—3*, 209 (1959).
11. Pavlu V., Schechter L., *Adaptor pentru înregistrarea directă la polarograful model Heyrovsky V-301*, Bul. Instit. politehnic București, *3—4* (1957).
12. Вишняков А. П., Сидорова Н. Д., *Метод надухания при исследовании действия ионизирующего излучения на твердые белковые поверхности*, Труды Ленинг. Химико. Фарм. Института, **VI**, 87(1959).
13. Вишняков А. П., Сидорова Н. Д., *Метод светорассеяния как способ определения влияния радиоизлучения на белок в растворе*, Труды Ленинг. Химико. Фарм. Института, **VI**, 82 (1959).

MODIFICĂRI ADAPTIVE ALE FOSFOMONOESTERAZEI ERITROCITARE ÎN CURSUL EVOLUȚIEI FILOGENETICE

DE

L. M. BURUIANĂ și EL. HADARAG

Rolul central al esterilor fosforici în metabolismul eritrocitelor presupune un mecanism specific pentru asigurarea concentrației optime a ionilor fosforici. Acesta se bazează în special pe activitatea enzimatică a stromatinei, proteina constitutivă a membranei globulei roșii, care fixează fosfații din plasmă sub forma unor compuși organofosforici cu greutate moleculară mare. În acest fel se asigură transportul fosfaților contra gradientului osmotic, ceea ce poate explica activitatea permeazică a membranei globulare față de aceștia. Ulterior, sub acțiunea fosfatazelor din interiorul globulei are loc eliberarea fosfaților indispensabili procesului glicolitic.

Într-adevăr, degradarea glucozei de către eritrocite se face conform schemei glicolizei anaerobe și a pentoz-fosfaților, procese metabolice pentru care concentrația în fosfați este hotărîtoare. Așa se poate explica și constatarea că, pe cînd activitatea fosfatazică a plasmei este redusă, aceea a globulelor este mare.

Unele din particularitățile fosfomonoesterazei acide eritrocitare (FME) au fost semnalate anterior [2], [3].

În lucrarea de față sînt redate cîteva observații în legătură cu modificările suferite de FME în cursul evoluției filogenetice la animale.

METODA DE LUCRU

Cercetările cu privire la această problemă s-au executat cu metoda gradientului termic enzimatic (GTE), care se bazează pe determinarea activității enzimatice la diferite temperaturi și trasarea dreptelor Arrhenius respective.

Temperaturile trebuie alese în așa fel încît proteina enzimatică să nu sufere o denaturare termică. În cazul fosfomonoesterazei eritrocitare aceasta corespunde limitelor de 0—40° C.

S-a constatat anterior [4] că sub influenţa temperaturii fosfomonoesteraza prezintă un salt calitativ. Aceasta ar corespunde după părerea lui I. V. Sizer [7], verificată recent de H. M. Levy şi colaboratori [5], modificărilor de structură ale proteinei enzimatice. Din punct de vedere biochimic, saltul este însoţit de modificarea energiei de activare a enzimei.

Cu ajutorul tehnicii descrise anterior [2] s-a determinat activitatea FME a globulelor roşii spălate şi lacate, la unele specii de animale diferit situate în scara evoluţiei, şi s-au trasat curbele Arrhenius respective. Aceasta permite calcularea grafică a temperaturii de tranziţie T_t şi a energiei de activare sub şi peste această limită.

REZULTATE

În figura 1 sînt înregistrate rezultatele obţinute, iar în tabelă sînt date valoarea punctului de tranziţie şi energia de activare în cazul speciilor cercetate.

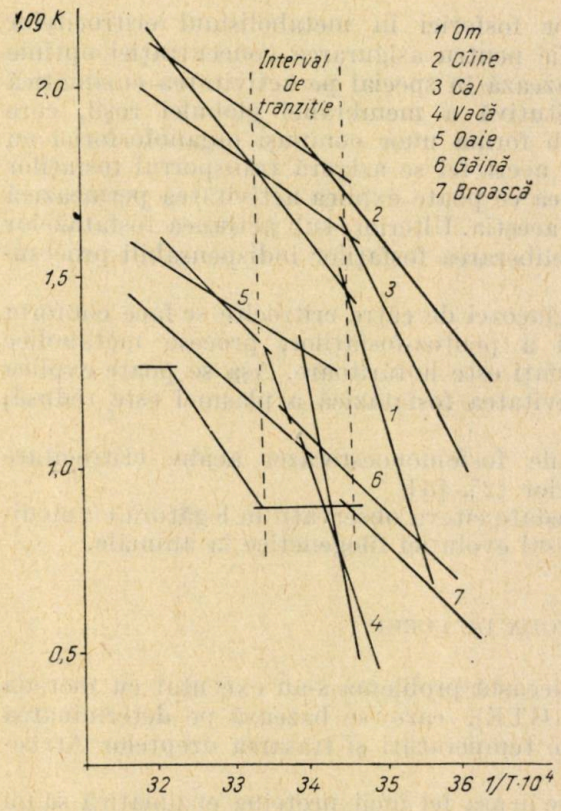


Fig. 1. — Curbele termice la diferite specii de animale.

Din cele de mai sus se vede că există o deosebire categorică între modul de comportare al FME la mamifere, păsări şi batraciene.

În cazul animalelor mai puţin evoluate, punctul de tranziţie este înlocuit cu un interval de tranziţie. Aspectul dreptei Arrhenius este foarte caracteristic la broască. Conform celor amintite mai sus, aceasta denotă că modificarea macrostructurii proteinei enzimatice sub influenţa temperaturii întîmpină o oarecare inerţie. Plasticitatea şi adaptabilitatea edificiului macromolecular proteic este mai mică în acest caz. Mai mult, ridicînd temperatura peste 25°C, se constată o scădere a calităţii enzimei (energia de activare creşte), ceea ce corespunde unei denaturări a proteinei enzimatice. Faptul este vizibil şi macroscopic, după turbiditatea soluţiei enzimatice, care se accentuează prin

ridicarea temperaturii peste 16°C. În cursul procesului de adaptare, intervalul de tranziție s-a îngustat pînă la a se reduce la un singur punct,

Tabelă

Valoarea temperaturii de tranziție și a energiei de activare la unele specii de animale

Specia	Temperatura de tranziție T_t	Energia de activare sub T_t cal/mol	Energia de activare peste T_t cal/mol
Om	19,0	34 545	7 369
Porc	22,0	18 750	7 500
Cîine	20,0	12 500	7 307
Vacă	21,0	54 500	6 000
Oaie	21,0	20 416	7 224
Găină	18–25	10 350	11 000
Broască	17–25	10 000	15 000

în cazul mamiferelor superioare, calitatea enzimei îmbunătățindu-se peste această temperatură (energia de activare scade).

DISCUȚII

Rezultatele obținute de noi cu această tehnică de lucru infirmă cercetările recente ale lui G. Siebert și A. Schnitt [6], după care nu există nici o diferență între temperatura de denaturare a proteinei enzimatice la hetero- și homeoterme.

Nepotrivirea se poate explica, în afara faptului că autorii citați au lucrat pe alte enzime (catepsină și glicil — glicin dipeptidaza), prin diferența dintre principiile care au stat la baza aprecierii activității enzimatice.

Metodele utilizate de Siebert și Schnitt pun accentul pe aspectul cantitativ al activității enzimatice, pe cînd metoda utilizată de noi, pe cel calitativ.

I. V. Blagoveșcenski [1] a atras atenția asupra deosebirii ce trebuie făcută între activitatea și nivelul energetic al enzimelor (arachimoza enzimelor) în cursul evoluției la plante.

Nesocotind criteriul calității și deci însușirile termodinamice ale sistemelor enzimatice, se pot trage concluzii greșite cu privire la rolul și însușirile acestor catalizatori biochimici, ceea ce poate explica numeroase contradicții întîlnite în domeniul enzimologiei.

După cum s-a semnalat și cu altă ocazie [4], se vede că metoda GTE se poate utiliza cu succes în studiul inhibiției enzimatice. Rezultatele de față arată eficiența acestei metode și în cercetarea altor probleme

ale enzimologiei, ceea ce ne face să preconizăm întrebuinţarea ei în cercetările de genetică şi ameliorare, la plante şi animale, fapt care face obiectul cercetărilor noastre actuale.

CONCLUZII

1. Utilizînd metoda gradientului termic enzimatic (GTE) pentru cercetarea modificărilor suferite de fosfomonoesteraza acidă eritrocitară (FME) în cursul evoluţiei filogenetice la animale, se constată că la animalele inferioare (găină, broască) punctul de tranziţie, al FME este înlocuit cu un interval de tranziţie, datorită adaptabilităţii mai reduse a proteinei enzimatice la factorul termic.

2. La broască se observă o denaturare a proteinei enzimatice chiar la temperaturi scăzute (sub 20°C), ceea ce denotă o labilitate mai mare a edificiului macromoleculei proteice la această specie.

3. Cercetările de faţă infirmă unele date care tind să demonstreze că proteinele enzimatice ale animalelor cu sînge rece ar fi tot atît de rezistente la factorul termic ca şi cele ale animalelor cu sînge cald. Această nepotrivire se explică prin criteriile diferite care au stat la baza metodelor de apreciere a activităţii enzimatice.

Prezentată la redacţie la 19 februarie 1962

Catedra de chimie biologică,
Facultatea de medicină veterinară,
Bucureşti

АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТНОЙ ФОСФОМОНОЭСТЕРАЗЫ ВО ВРЕМЯ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ

РЕЗЮМЕ

Авторы применяют метод энзиматического термического градиента (ЭТГ) с целью изучения изменения поведения кислой эритроцитной фосфомоноэстеразы (ФМЭ) во время эволюции животных.

Согласно некоторым предыдущим работам, ФМЭ характеризуется тем, что ее активность представляет качественный скачок при известной температуре, именуемой температурой перехода ($T_п$).

Энергия активации изменяется для этой точки: ее значения уменьшаются, что соответствует улучшению качества энзима.

В случае низших животных (птицы, земноводные) точка перехода становится интервалом перехода, а энергия активации возрастает. Это можно объяснить изменением энзиматического белка (процесс этот заметен макроскопически), что указывает на менее выраженную приспособляемость в данном случае. Отсюда следует, что в процессе эво-

люции видов, приспособляемость сопровождается изменением качества некоторых энзимов.

Предлагается применять этот метод (ЭТГ) в изучении генетики и мелиорации растений и животных.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКА

Рис. 1. — Термические кривые для различных видов животных.

MODIFICATIONS ADAPTATIVES DE LA PHOSPHO-MONOESTÉRASE ÉRYTHROCYTAIRE AU COURS DE L'ÉVOLUTION PHYLOGÉNÉTIQUE

RÉSUMÉ

On emploie la méthode du gradient thermique enzymatique (GTE) pour étudier la variation du comportement de la phospho-monoestérase acide érythrocytaire (PME) au cours de l'évolution chez les animaux.

D'après des recherches antérieures, la PME est caractérisée par le saut qualitatif de son activité à une certaine température, nommée température de transition (T_t).

L'énergie d'activation subit des modifications en ce point, ayant des valeurs moindres qui correspondent à une amélioration de la qualité de l'enzyme.

Dans le cas des animaux inférieurs (oiseaux, batraciens) le point de transitions est remplacé par un intervalle de transition et l'énergie d'activation augmente.

Ceci peut être expliqué par une dénaturation de la protéine enzymatique — processus visible a l'œil nu — fait qui dénote une adaptabilité plus réduite dans ce cas. Il s'ensuit que l'adaptation au cours de l'évolution des espèces est accompagnée d'une modification qualitative de certaines enzymes.

On préconise l'application de la méthode du GTE aux recherches génétiques et aux travaux d'amélioration des plantes et des animaux.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Courbes thermiques chez diverses espèces d'animaux.

BIBLIOGRAFIE

1. BLAGOVEȘCENSCHI I. V., *Bazele biochimice ale procesului de evoluție la plante*, traducere din l. rusă, Ed. agro-silvică de Stat, 1953.
2. BURUIANĂ L. M., HADARAG E., VARACHIU N., *Modificarea activității fosfomonoesterazei eritrocitare la cal în urma efortului*, Studii și cercetări de biochimie, **I**, *2*, 115 (1958).

3. BURUIANĂ L. M., HADARAG E., VARACHIU N., *Acţiunea unor efectori asupra activităţii fosfomonoesterazei eritrocitare*, Studii şi cercetări de biochimie, **II**, *2*, 129 (1959).
4. BURUIANĂ L. M., HADARAG E., *Studiul dreptelor Arrhenius în cazul fosfomonoesterazei eritrocitare*, Studii şi cercetări de biochimie, **III**, *2*, 141 (1960).
5. LEVY H. M., SHARON N., KOSHLAND D. E., jr., *Purified muscle proteins and the walking rate of ants*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **45**, *6*, 785 (1959).
6. SIEBERT G., SCHNITT A., MALORITE R. V., *Termische denaturierung von kaltblüter Enzymproteine*, Experientia, **16**, *11*, 491 (1960).
7. SIZER I. W., *Effects of temperature of enzyme kinetics*, Advances in Enzymology, **III**, 35 (1943).

PRODUCEREA RIBOFLAVINEI PRIN BIOSINTEZĂ

DE

I. VASILESCU şi G. BOLTAŞU

Riboflavina, lactoflavina sau vitamina B_2 este o substanţă ce intră în compoziţia coenzimelor flavinice care îndeplinesc funcţia de transportori de hidrogen în reacţiile de oxido-reducere din celula vie. Datorită acestui fapt riboflavina este foarte răspîndită în lumea vie şi s-a găsit în toate organismele cercetate pînă acum.

Riboflavina este sintetizată de plantele superioare şi de un mare număr de microorganisme ; animalele şi unele microorganisme sînt lipsite de posibilitatea de a sintetiza această substanţă. Pentru aceste vieţuitoare riboflavina îndeplineşte funcţia de vitamină sau factor de creştere.

Sinteza riboflavinei de către microorganisme şi de către plantele superioare este limitată la cantităţi mici, catalitice, de care ele au nevoie în procesele lor fiziologice. Există însă ciuperci din clasa *Ascomycetelor* ca *Eremothecium ashbyii* şi *Ashbya gossypii* care sintetizează riboflavina în cantitate mult mai mare decît sînt nevoile lor fiziologice. Riboflavina se acumulează în vacuole în timpul dezvoltării ciupercilor şi este eliberată treptat în mediul de cultură. Aceste ciuperci se folosesc în prezent pentru producerea industrială a concentratelor de vitamină B_2 destinate creşterii animalelor şi pentru prepararea vitaminei B_2 pure folosită în scopuri farmaceutice.

Producerea riboflavinei prin biosinteză a fost foarte mult cercetată, cu scopul de a mări concentraţia de riboflavină acumulată în mediu şi de a găsi medii de cultură ieftine şi tehnologii de fabricare cît mai simple [1], [2].

În lucrarea de faţă s-a urmărit stabilirea unei tehnologii de fabricare în ţară a riboflavinei pentru nevoile zooveterinare şi farmaceutice. În acest scop s-au cercetat : 1) microorganismul : selecţia unei tulpini cu potenţial ridicat de producere a riboflavinei, stabilirea tehnicii de întreţinere a microorganismului, pentru păstrarea potenţialului ridicat de producţie, şi stabilirea unui inocul viguros şi uşor de manipulat ; 2) fermentaţia : stabilirea compoziţiei unui mediu de fermentaţie înalt pro-

ductiv, ieftin, cu posibilităţi de aplicare în industrie şi stabilirea parametrilor optimi de fermentare; 3) izolarea şi purificarea riboflavinei pînă la nivelul unui produs farmaceutic şi prepararea unui concentrat de vitamină B_2 furajer.

MATERIALE ŞI METODE

Microorganismul. S-au cercetat mai multe tulpini de *Eremothecium ashbyii* şi *Ashbya gossypii* din colecţia Institutului de cercetări chimico-farmaceutice, din care s-a selecţionat o tulpină de *Eremothecium ashbyii* ICCF nr. 10. Microorganismul s-a întreţinut conform metodei recomandate de J. Hollo [3], prin treceri alternative pe medii diferite lichide, solide, agitate şi neagitate.

Metode de cultivare. Culturile de laborator s-au făcut în vase Erlenmeyer de 500 ml cu 50 ml mediu de cultură. Incubarea a avut loc la 28°C, sub agitare, pe un agitator rotativ excentric cu 280 rot/min. Fermentaţiile pilot s-au făcut în fermentatoare de oţel inoxidabil de 50 l, prevăzute cu posibilităţi de sterilizare, agitare, aerare, termostatare şi condiţii de lucru aseptice.

Pentru mediile de întreţinere a microorganismului s-au folosit: glucoză purificată, peptonă Witte, extract de porumb, must de malţ şi fosfat bipotasic pur. Pentru mediile de fermentaţie în laborator şi pilot, s-au utilizat: extract de carne Lab-Lemco, germeni de malţ, clorură de sodiu tehnică, făină de sînge, făină de peşte, diferite bulioane rezultate din fierberea cărnurilor de la fabricile de mezeluri şi ecarisaj.

Agenţi de precipitare ai riboflavinei din mediile filtrate. S-a folosit ca agent chimic hidrosulfitul de sodiu tehnic iar ca agenţi microbiologici culturi de 24 ore de *Strept. faecalis*, *Strept. liquefaciens* şi *Strept. zymogenes*, dezvoltate pe bulion.

Metode de analiză. Dozarea riboflavinei în mediile fermentate, infiltrate, în lichidele din diferitele faze de purificare şi în produsul finit s-a făcut fluorometric.

Soluţii: permanganat de potasiu soluţie 4%,
apă oxigenată soluţie 3%,
acid acetic glacial,
riboflavină etalon soluţie stoc în acid acetic n/50,
10 mg/100 ml.

Pentru dozarea concentraţiei totale de riboflavină din mediu şi miceliu este necesară eliberarea riboflavinei din miceliu. Aceasta se face după cum urmează: 50 ml din mediul fermentat integral şi bine omogenizat, se aduc la pH 2,5—3,0 cu H_2SO_4 50%, se încălzeşte materialul sub agitare uşoară la 90°C, se lasă să stea la întuneric 15 min şi apoi se filtrează. Analiza se efectuează pe filtratul limpede.

Se diluează proba la 1 : 50 sau la 1 : 100. Se iau 10 ml în care se adaugă 0,5 ml soluţie MnO_4K 4% şi 1 ml acid acetic glacial. Din momentul adăugării acidului acetic se aşteaptă 2 min apoi se adaugă 0,5 ml soluţie H_2O_2 3%. Se agită pînă la decolorarea permanganatului de

potasiu. Se efectuează în paralel o probă martor pe 10 ml soluție etalon diluată la 10 μg/ml. Se citește fluorescența la un fluorometru cu filtrul L_1 în transmisie.

Pentru analiza cromatografică a mediilor fermentate s-a folosit hîrtie Whatman nr. 1 și s-a aplicat tehnica descendentă. Ca solvent de developare s-a folosit un amestec de butanol — acid acetic — apă (4 : 1 : 5). Observarea spoturilor s-a făcut după evaporarea solventului, prin expunerea hîrtiei în lumină ultravioletă. Pentru determinare, mediul s-a diluat pînă la o concentrație de aproximativ 100 μg/ml riboflavină din care s-a aplicat 0,01 ml. Ca martor s-a folosit riboflavină p. a. soluție 100 μg/ml, aplicîndu-se 0,01 ml. Durata developării a fost de 24 ore.

Dozarea glucozei din mediile de cultură s-a făcut după metoda Bertrand.

Azotul aminic din mediile de cultură s-a determinat după metoda Sörensen.

pH-ul s-a determinat electrometric, folosind electrodul de sticlă.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Variabilitatea și întreținerea microorganismului. Tulpinile de *Eremothecium ashbyii* se caracterizează printr-o mare variabilitate care se constată uneori chiar de la o trecere la alta pe același mediu de cultură [4], [5], [6].

Variabilitatea se poate observa ușor aplicînd metoda Koch de izolare în cultură pură a microorganismelor, cînd diferitele colonii dezvoltate izolat apar pigmentate diferit de la alb la slab galben, galben pînă la brun. Cercetări numeroase au arătat că între intensitatea pigmentației coloniilor și capacitatea tulpinii de a sintetiza riboflavina, există o strînsă corelație [3], [4], [5], [7], [8]. Tulpinile care dau culturi puternic pigmentate dau în timpul fermentației și cele mai mari concentrații de riboflavină.

Formele de *Eremothecium ashbyii* cu o slabă putere flavinogenică apar la trecerea repetată a tulpinii pe același mediu de cultură. Datorită acestui fapt, o tulpină puternic producătoare de riboflavină începe să slăbească în activitatea sa după un anumit timp de trecere pe același mediu de cultură, deoarece ea nu mai reprezintă o cultură pură ci un amestec de diferite forme cu puteri flavinogenice diferite. Pentru combaterea acestei variabilități s-au încercat mai multe soluții dintre care cele mai bune rezultate le-a dat trecerea alternativă a culturii la intervale de timp regulate pe medii de compoziții diferite [3], [6]. Aplicînd această tehnică de întreținere în cazul tulpinii noastre timp de doi ani de zile, am constatat că după un an de zile, activitatea tulpinii a început să scadă. Pentru a readuce tulpina la activitatea ridicată inițială, s-a încercat reizolarea ei în cultură pură după metoda Koch a tulpinii înalt productive, alegînd din coloniile dezvoltate pe placă pe cele mai intens pigmentate. Noile culturi au fost apoi întreținute în modul obișnuit. Procedînd astfel s-a reușit să se ajungă din nou la activități ridicate.

În concluzie putem afirma că asociind metoda trecerilor alternative pe medii de compoziții diferite, cu selecția periodică de tulpini din coloniile

puternic pigmentate, am reuşit să avem în permanenţă o tulpină de *Eremothecium ashbyii* înalt productivă.

Morfologia şi faze de dezvoltare. Eremothecium ashbyii face parte din clasa *Ascomycetelor*. Studiul morfologic al acestei ciuperci a fost făcut de Guilliermond [7], [4]. În dezvoltarea sa pe diferite medii *Eremothecium ashbyii* prezintă transformări morfologice nete care se pot observa uşor în special atunci cînd cultivarea se face pe medii lichide.

E. M. Dikanskaia, cultivînd ciuperca pe un mediu lichid neagitat şi urmărind dezvoltarea ei timp de 20—22 zile, a arătat că în dezvoltarea ciupercii se pot deosebi cinci faze [5]. Deoarece în condiţiile de lucru industriale ciuperca se dezvoltă într-un mediu lichid agitat, iar ciclul de dezvoltare este mult mai scurt, maximum 5 zile, am considerat util să urmărim evoluţia morfologică a ciupercii şi în aceste condiţii. În urma lucrărilor efectuate atît în vase de sticlă agitate cît şi în fermentatoare metalice pilot, s-a stabilit că cele cinci faze de dezvoltare, caracteristice culturilor statice, se regăsesc şi în cazul culturilor agitate. Caracterele deosebitoare pentru cele cinci faze sînt următoarele :

Faza 1, 0—10 ore. Are loc germinarea intensă a sporilor. Germinarea sporilor se face lateral, printr-o hifă scurtă care se ramifică dichotomic. Conţinutul protoplasmatic este dens, hialin.

Faza 2, 10—24 ore. Hifele se dezvoltă abundent, se alungesc şi se împîslesc. În conţinutul protoplasmatic apar vacuole mici. Pe traiectul hifelor apar septe care împart hifele în celule. Încep să se formeze sporangii.

Faza 3, 24—48 ore. Masa miceliană continuă să crească. Vacuolele se măresc şi iau forme rotunde sau prismatice. În jurul vacuolelor apar numeroase picături de grăsime. În sporangi se formează sporii, dar foarte puţini sînt puşi în libertate.

Faza 4, 48—96 ore. Sporii sînt eliberaţi în mediu. În celulele hifelor protoplasma devine granulară, iar picăturile de grăsime se măresc fiind în jurul vacuolelor care ocupă aproape tot conţinutul hifelor. Se observă numeroşi sporangi lipsiţi de conţinut sau rupţi din lanţul hifelor. Unii spori, puţini la număr, germinează şi formează hife tinere, care mai departe formează noi sporangi.

Faza 5, 96—120 ore. Miceliul îmbătrînit intră în autoliză. Hifele se rup, la microscop se văd fragmente de hife lipsite de conţinut. Foarte puţini sporangi în maturare.

Materialul de însămînţare. Ca material de însămînţare a mediilor de fermentaţie literatura recomandă un inocul vegetativ în proporţie de 10%, dezvoltat submers în medii lichide agitate [1]. Inoculul vegetativ prezintă două dezavantaje : *a*) o dată pregătit nu se poate conserva, din cauza proceselor metabolice active care se petrec în cultură şi care, în cele din urmă, duc la autoliză ; *b*) inoculul vegetativ se contaminează uşor cu germeni străini, prin manipulările care se fac în timpul însămînţărilor şi dezvoltării. Pentru evitarea acestor dezavantaje s-a încercat folosirea unui inocul sporulat, dezvoltat pe un mediu solid, similar inoculului folosit la fabricarea penicilinei. S-au obţinut rezultate bune cînd s-a folosit ca mediu de dezvoltare mei decorticat, fiert în must de malţ, în proporţie de 1 : 1.

Calitatea inoculului dezvoltat pe mei s-a controlat în timp, determinînd la interval de 1 lună, timp de 3 luni, procentul de germinare a sporilor, sterilitatea, capacitatea de a produce riboflavină şi variabilitatea, înţelegîndu-se prin aceasta din urmă procentul de colonii albe sau slab pigmentate din totalul coloniilor dezvoltate pe placă.

Rezultatele sînt date în tabela 1.

Tabela 1

Controlul în timp al inoculului pe mei

Probe	Timp de control în luni		
	1	2	3
Procent de germinare	82	80	81
Sterilitate	steril	steril	steril
Activitate, μg/ml	720	600	650
Variabilitate, %	20	23	21

După cum se vede din tabelă, inoculul pe mei se poate folosi şi după 3 luni de conservare. Pentru însămînţarea mediilor de fermentare s-a găsit că este suficientă o cantitate de inocul de 0,1% faţă de mediu, deoarece inoculul pe mei este intens sporulat şi procentul sporilor viabili este ridicat, de circa 80%.

Verificînd calitatea acestui inocul în fermentatoarele metalice pilot, s-a constatat că în aceste condiţii sporii germinează lent în decurs de 48—72 ore. Pentru a elimina acest neajuns s-au supus sporii unei pregerminări într-un mediu lichid neagitat, timp de 72 ore, şi după aceea s-a făcut însămînţarea mediului de fermentaţie. Inoculul pregătit pe mei şi pregerminat cum s-a arătat mai sus s-a dovedit superior inoculului vegetativ obişnuit şi a fost folosit în fermentaţiile din fermentatoarele metalice pilot.

Stabilirea mediului de fermentaţie pentru condiţiile de lucru din vasele agitate. Din motive economice mediile folosite în industrie pentru producerea riboflavinei trebuie să fie cît mai ieftine. Literatura de specialitate recomandă produse agricole ieftine şi subproduse sau deşeuri din industria alimentară [3]: glucoză brută, melasă, extract de drojdie, extract de carne, subproduse din industria laptelui, rezidii de la distilerii, extract de porumb, must de malţ, cazeină etc.

După experimentarea mai multor reţete de medii recomandate de literatură [3], [5], am stabilit că mediul cu compoziţia: glucoză 2%, must de malţ de 8° Bg. 2,5%, extract de carne Lab-Lemco 2%, germeni de malţ 0,5%, clorură de sodiu 0,25%, poate servi ca mediu martor de bază la stabilirea mediului de fermentaţie industrial pentru tulpina *Eremothecium ashbyii* ICCF nr. 10.

Pentru stabilirea unui mediu de fermentaţie industrial, ieftin şi înalt productiv, la mediul de bază s-au adus rînd pe rînd modificări în compoziţie, înlocuind ingredientele scumpe cu altele apropiate, mai ieftine sau suprimînd anumite ingrediente şi mărind concentraţia altora. Pentru

fiecare variantă de mediu s-a determinat concentraţia de riboflavină obţinută, comparativ cu mediul martor.

Experienţe de înlocuire a extractului de carne. S-a încercat înlocuirea extractului de carne cu bulioane rezultate de la fabricile de mezeluri, cu bulion rezultat din fierberea cărnurilor alterate şi inferioare de la ecarisaj, făină de sînge, făină de peşte, făină de carne. Sortimentele alese au fost adăugate mediului fie în aceeaşi proporţie cu extractul de carne, fie în proporţii diferite, unele adăugate ca atare, altele după o prealabilă prelucrare enzimatică.

Rezultatele obţinute sînt date în tabela 2.

Tabela 2

Influenţa sursei de proteine animale asupra randamentului de riboflavină

Sortiment	Cant. %	µg/ml riboflavină
Extract de carne Difco	2	1 000
Macerat de carne	80 ml	800
Făină de sînge	2	400
Făină de peşte	2	400
Zeamă de şrot coagulată (ind. mezeluri)	2	1 200
,, ,, ,,	1,5	200
,, ,, ,,	1	100
,, ,, ,,	0,5	100
Zeamă de şrot digerată triptic (ind. mezeluri)	2	1 200
,, ,, ,, ,,	1,5	100
,, ,, ,, ,,	1	200
,, ,, ,, ,,	0,5	200
Zeamă de şrot digerată cu pancreatină şi coagulată	2	400
,, ,, ,, ,, ,,	1,5	200
,, ,, ,, ,, ,,	1	100
,, ,, ,, ,, ,,	0,5	100
Bulion de urechi neprelucrat	2	500
Bulion de urechi hidrolizat triptic	2	400
Zeamă de şrot digerată cu pancreatină, fără coagulare	2	100
Bulion ecarisaj neprelucrat	2	1 400
Bulion de ecarisaj digerat cu pancreatină	2	800
Zeamă de şrot digerată triptic, sub toluen	2	500
Bulion ecarisaj hidrolizat triptic, sub toluen	2	600
Praf de carne	2	600

Din toate sortimentele încercate, bulionul de ecarisaj neprelucrat a dat cele mai bune rezultate. Acest bulion are un conţinut în materie uscată de 10—20%.

Bulionul de ecarisaj este uşor alterabil; conservarea se poate face prin concentrare pînă la 30—40% substanţă uscată şi adaos de 0,08% nitrofuran.

Factorii de creştere (germeni de malţ şi must de malţ). Mustul de malţ se poate înlocui cu o cantitate de extract de porumb echivalentă ca substanţă uscată în dauna randamentului, care scade cu 20%. Germenii de malţ sînt necesari ca stimulatori de creştere; proporţia lor redusă şi preţul lor scăzut nu pune problema înlocuirii cu alte sortimente.

G l u c o z a. S-a încercat reducerea cantității de glucoză și înlocuirea glucozei purificate cu sortimente de glucoză industriale, melasă sau cu bulion de carne. Micșorarea cantității de glucoză sub 2% sau înlocuirea ei cu melasă se răsfrîng nefavorabil asupra producției de riboflavină. Folosirea glucozei sirop sau solide nu a modificat randamentul de riboflavină. Suprimarea totală a glucozei, paralel cu dublarea cantității de bulion de carne (ecarisaj) dă rezultate comparabile cu martorul. În tabela 3 sînt date rezultatele experiențelor privind influența glucozei.

Tabela 3

Influența cantității și sortimentului de glucoză asupra randamentului de riboflavină

Componente %				μg/ml riboflavină
Glucoză purificată	Glucoză sirop	Melasă	Bulion ecarisaj	
2	—	—	2	1 100
1	—	—	—	750
—	—	—	4	1 150
—	—	2	—	650
1	—	—	2	850
—	2	—	2	1 100

Pe baza datelor experimentale obținute s-a stabilit următoarea rețetă de mediu pentru fermentațiile din laborator la vase agitate : glucoză tehnică 2%, must de malț de 8° Bg. 2,5%, germeni de malț 0,5%, bulion de carne de ecarisaj 2,5% (calculat ca substanță uscată) sau 5% în cazul renunțării la glucoză, clorură de sodiu 0,25%.

Lucrări efectuate în fermentatoare metalice pilot de 50 l capacitate. Condițiile de lucru din fermentatoarele metalice pilot se aseamănă cu cele din industrie, deoarece fermentatoarele pilot sînt construite după aceleași principii. Prin experiențele efectuate în instalația pilot s-a urmărit stabilirea condițiilor de sterilizare a mediului, stabilirea parametrilor optimi de fermentare și definitivarea compoziției mediului de fermentare în condițiile de lucru pilot.

S t e r i l i z a r e a m e d i u l u i. Experiențele de sterilizare a mediului s-au făcut cu scopul de a stabili temperatura și durata de sterilizare a mediului care să asigure distrugerea tuturor formelor vegetative și sporulate ale microorganismelor din mediul de cultură, fără ca în mediu să apară produși de degradare termică care să dăuneze dezvoltării microorganismului. Sterilizarea completă a mediului de cultură și menținerea sterilității în timpul fermentației sînt condiții esențiale pentru reușita fermentațiilor de riboflavină. Microorganismul *Eremothecium ashbyii* este lipsit de capacitatea de a se apăra singur prin elaborarea de substanțe bacteriostatice sau bactericide, iar mediul de fermentație este foarte prielnic dezvoltării unui mare număr de microorganisme, în special a bacteriilor. Contaminarea mediului de fermentație cu microorganisme străine duce la scăderea simțitoare a randamentului și la greutăți în obținerea unei riboflavine pure din medii fermentate contaminate.

O sterilizare eficace a mediului de fermentaţie se obţine prin autoclavare la 120—124°C , timp de 45 min, cu adăugarea unei substanţe bactericide, şi anume a nitrofuranului în concentraţie de 1 : 50 000. Această concentraţie de nitrofuran nu este nocivă pentru *Eremothecium ashbyii*, dar asigură o oarecare protecţie faţă de infecţiile bacteriene survenite în timpul fermentaţiei [9]. În acelaşi scop se recomandă şi folosirea penicilinei [2].

P r e s i u n e a, d e b i t u l d e a e r i n s u f l a t, v i t e z a a g i t ă r i i. Datele prezentate de diferiţi cercetători asupra acestor trei parametri sînt destul de contradictorii. Autorii japonezi lucrează la 1 atmosferă suprapresiune şi un debit de aer insuflat de 0,7 l/l mediu min [10].

Experienţele noastre, date în tabela 4, duc la concluziile următoare :

Tabela 4

Stabilirea parametrilor de fermentaţie pentru producerea riboflavinei

Presiune at	Aeraţie l/l min	Agitaţie rot/min	μg/ml vitamină B_2
1	1	360	250
0,2	0,25	360	650
0,2	0,6	360	dezvoltat, activit. nulă
0,2	0,6	360	,, ,, ,,
1	0,6	360	180
1	0,25	360	185
0,5	0,25	360	100
0,2	0,07	360	400
0,2	0,25	360	850
0,2	0,25	600	620
0,2	0,25	160	1 100

Suprapresiunea optimă este de 0,2 atm, presiunile mai mari de 0,5 şi 1 atm micşorează producerea de riboflavină şi modifică morfologia ciupercii (miceliul devine globular). Debitul de aer optim este de 0,25 l aer/l mediu min. Debitele de aer mai mari micşorează conţinutul de riboflavină aproape de zero. Viteza agitării este un factor important în obţinerea de concentraţii superioare de riboflavină ; în general vitezele mici sînt mai favorabile decît cele mari. Viteza de 160 rot/min a dus la concentraţii de riboflavină de 1100 μg/ml, iar viteza de 360 rot/min a dus la concentraţii medii de 650—850 μg/ml riboflavină. Viteze de agitare şi mai mari scad şi mai mult formarea riboflavinei. Temperatura în timpul fermentaţiilor s-a menţinut la 28 ± 1°C. Durata fermentaţiei a fost de 5 zile.

pH-ul optim de elaborare a riboflavinei este cuprins între 6 şi 7. pH-ul mediului variază în timpul fermentaţiei. Prin metabolizarea glucozei apar acizi organici care scad pH-ul mediului, iar apoi, prin metabolizarea mai departe a acestor acizi, pH-ul urcă din nou. S-a încercat reducerea limitelor de oscilaţie a pH-ului prin introducerea glucozei în porţiuni în timpul fermentaţiei. Procedînd astfel, s-a obţinut o creştere a concentraţiei riboflavinei în mediu, de exemplu proba martor a dat 720 μg riboflavină pe 1 ml de mediu, iar proba la care glucoza s-a adăugat în porţiuni a dat 1 100 μg riboflavină pe 1 ml mediu.

În cursul fermentațiilor s-a urmărit variația glucozei, azotului aminic și formarea riboflavinei. În figura 1 sînt date grafic rezultatele obținute.

Azotul aminic scade treptat în primele 70 de ore, apoi urmează o creștere lentă care marchează începutul autolizei miceliului. pH-ul mediului scade după sterilizare cu 1,0—1,5 unități. În primele 24 de ore, în

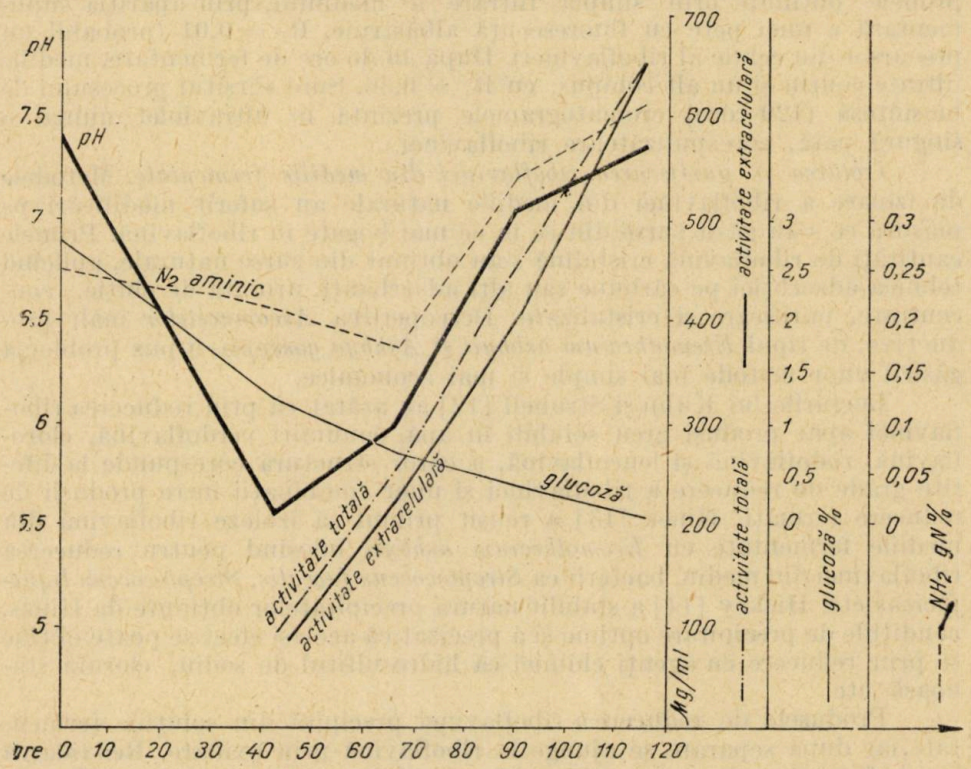


Fig. 1. — Variația pH-ului, azotului aminic, glucozei și formarea riboflavinei în cursul unei fermentații.

urma metabolizării glucozei pH-ul are tendința să scadă sub 6. Prin corectarea pH-ului cu NaOH, după sterilizare, la valoarea 6,5 se evită scăderea pH-ului în timpul fermentației la valori nefavorabile biosintezei riboflavinei. Variația pH-ului în timpul fermentației prezintă un aspect caracteristic : după o scădere de circa 1—2 unități în primele 24 de ore, urmează o creștere treptată care în momentul autolizei atinge valori peste 7. Modificarea curbei pH-ului indică apariția infecțiilor [3].

Riboflavina apare la început ca metabolit intracelular apoi trece și în mediul de cultură pentru ca în ultima fază să fie eliberată în întregime în mediul de cultură.

Dozînd riboflavina extracelulară și pe cea totală (intracelulară și extracelulară) se poate determina momentul atingerii nivelului maxim de biosinteză (fig. 1).

Analizînd cromatografic formarea riboflavinei s-a constatat că aceasta apare liberă în mediu chiar după primele 24 de ore. Fluorescenţa petei situate la acelaşi nivel cu martorul de riboflavină pură ($R_f = 0,43$) se accentuează proporţional cu creşterea conţinutului de riboflavină din mediu. Probele de riboflavină totală (intra- şi extracelulară) diferă de probele obţinute prin simpla filtrare a mediului, prin apariţia suplimentară a unei pete cu fluorescenţă albăstruie, $R_f = 0,01$ (probabil un precursor din celule al riboflavinei). După 40 de ore de fermentare, mediile filtrate conţin şi un alt compus, cu $R_f = 0,36$. Spre sfîrşitul procesului de biosinteză (120 ore) cromatogramele prezintă în ultraviolet numai o singură pată, corespunzătoare riboflavinei.

Izolarea şi purificarea riboflavinei din mediile fermentate. Metodele de izolare a riboflavinei din mediile naturale au suferit modificări pe măsură ce s-au găsit surse din ce în ce mai bogate în riboflavină. Primele cantităţi de riboflavină cristalină s-au obţinut din surse naturale, aplicînd tehnica adsorbţiei pe cărbune sau alţi adsorbanţi, urmată de eluţie, concentrare, purificare şi cristalizare. Descoperirea *Ascomycetelor* înalt productive, de tipul *Eremothecium ashbyii* şi *Ashbya gossypii*, a pus problema găsirii unor metode mai simple şi mai economice.

Lucrările lui Kuhn şi Strobell [12] au arătat că prin reducerea riboflavinei apar produşi greu solubili în apă, denumiţi verdoflavină, cloroflavină, rodoflavină şi leucoflavină, a căror structură corespunde la diferite grade de reducere a riboflavinei şi unor combinaţii între produşii de reducere formaţi. Hines [13] a reuşit primul să izoleze riboflavină din mediile fermentate cu *Eremothecium ashbyii* folosind pentru reducerea riboflavinei din mediu, bacterii ca *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus liquefaciens* etc. Hickey [14] a stabilit natura precipitatelor obţinute de Hines, condiţiile de precipitare optime şi a precizat că acelaşi efect se poate obţine şi prin reducere cu agenţi chimici ca hidrosulfitul de sodiu, clorura stanoasă etc.

Produsele de reducere a riboflavinei precipită din soluţiile fermentate, iar după separare se ajunge la riboflavină prin oxidare. Reoxidarea la riboflavină se face uşor, chiar prin simplul contact cu oxigenul din aer [15]. Produsul brut are un conţinut de 90% riboflavină care se purifică prin diferite metode prin recristalizare.

Izolarea şi purificarea riboflavinei din mediile fermentate au fost mult studiate deoarece procesul de izolare şi purificare depinde în mare măsură de mediul de cultură folosit pentru cultivarea microorganismului şi de metabolismul particular al diferitelor tulpini de *Eremothecium ashbyii*.

În lucrările noastre de izolare şi purificare am urmărit să obţinem riboflavina cu un grad de puritate corespunzător nevoilor farmaceutice. Calea urmată a fost următoarea:

Filtrarea şi clarificarea mediilor fermentate. Producţia maximă de riboflavină coincide cu autoliza miceliului ciupercii. În urma autolizei apar în mediu substanţe care fac imposibilă clarificarea prin filtrare sau centrifugare. Din cauza proprietăţilor oxido-reducătoare ale substanţelor din suspensii, mediile neclarificate împiedică izolarea riboflavinei prin precipitare cu agenţi chimici. S-au făcut încercări de clarificare cu deter-

genți, termocoagulare și variații de pH. Rezultate bune am obținut prin coborîrea pH-ului cu acid sulfuric pînă la 3—3,5 și încălzire la 80°C. Dacă durata încălzirii nu depășește 30 min pentru 80°C sau 5 ore pentru 55°C și dacă se protejează soluțiile de acțiunea luminii, atunci nu au loc pierderi de riboflavină prin degradare.

Precipitarea și izolarea riboflavinei reduse. Prin tratare cu hidrosulfit de sodiu a mediilor clarificate, riboflavina precipită sub formă de produși de reducere. Dacă precipitarea se face cu o cantitate triplă de hidrosulfit de sodiu față de riboflavina existentă și la un pH din domeniul acid (circa 3), randamentul de precipitare ajunge la 93,5%. Precipitarea are loc în timp și este completă în 12—24 ore. După colectarea precipitatului prin decantare și centrifugare, se poate efectua oxidarea în riboflavină prin suspendare într-o soluție apoasă de cloramină [16], sau prin reoxidare în timpul procesului de recristalizare. Ultimul procedeu a condus la randamente mai bune și la purități mai avansate decît primul.

Recristalizarea riboflavinei. Această operație s-a încercat din soluții alcoolice, soluții acide, din soluții de NaOH și din solvenți organici. Rezultatele cele mai bune le-am obținut prin recristalizare din soluții acide, printr-o tehnică modificată după Berezovschi [17]. Riboflavina obținută prin recristalizare din HCl 24% în prezență de perhidrol, are un conținut de 94% riboflavină, dozată după conținutul în azot și spectrofotometric, și un conținut de 97—99% conform dozărilor fluorometrice. O purificare mai avansată s-a obținut prin recristalizarea riboflavinei din fenol.

Prepararea unui concentrat de vitamină B_2 furajer. Pentru preparatele vitaminice destinate scopurilor furajere, problema purității preparatelor nu se pune decît în măsura în care substanțele însoțitoare, străine de vitamină, sînt dăunătoare sănătății animalului. Este bine însă ca preparatul să fie cît mai concentrat în vitamină și conținutul în vitamină să fie bine cunoscut, pentru a se putea stabili doza ce trebuie adăugată la furaj. În cazul nostru mediul de cultură în care s-a format riboflavina conține numai substanțe nutritive folosite curent în hrana animalelor, iar miceliul ciupercii este el însuși un furaj prețios prin substanțele proteice pe care le conține și complexul de vitamine diferite de B_2. În consecință separarea riboflavinei de aceste substanțe nu este necesară. Dimpotrivă, prezența lor este dorită deoarece valoarea nutritivă a preparatului este și mai mare.

O tehnologie simplă de obținere a concentratelor de vitamina B_2 ar fi concentrarea în vacuum a mediului fermentat, pînă la consistența de pastă, urmată de uscarea concentratului pe tăvi, în curent de aer cald sau pe valțuri în vacuum. Pentru a evita evaporarea unei cantități mari de apă, ne-am gîndit să evităm faza de concentrare, prin precipitarea riboflavinei cu hidrosulfit după tehnica descrisă, urmînd ca după aceea să separăm precipitatul de riboflavină redusă împreună cu miceliul, prin filtrare, și să uscăm numai precipitatul. Această tehnologie nu a dat rezultate, deoarece precipitarea riboflavinei prin adăugare de hidrosulfit de sodiu nu a fost cantitativă din cauza prezenței în suspensii (miceliu, precipitate) a unor substanțe care au reacționat și ele cu hidrosulfitul de sodiu. Metoda a dat rezultate bune atunci cînd s-a făcut o separare prea-

labilă a miceliului după tehnica arătată la izolarea şi purificarea riboflavinei din mediile fermentate şi tratarea cu hidrosulfit de sodiu făcîndu-se apoi pe mediul limpede.

Precipitatul de riboflavină redusă, separat prin sedimentare sau centrifugare, s-a amestecat apoi cu masa de miceliu separată prin filtrare şi s-a uscat pe tăvi în curent de aer cald. S-a obţinut un produs care conţinea 20 mg riboflavină pe 1 g substanţă uscată şi care avea un conţinut în substanţe proteice de 35% calculat din azotul total.

O reducere cantitativă a riboflavinei fără separarea prealabilă a miceliului, este posibilă dacă se folosesc ca agenţi de reducere microorganismele : *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus liquefaciens* şi *Streptococcus zymogenes*.

Prin însămînţarea mediului fermentat de riboflavină cu o cultură din microorganismele citate, aerare timp de 2 ore şi fermentare timp de 22 ore, riboflavina din mediu a fost aproape complet precipitată putîndu-se separa o dată cu masa de miceliu şi microorganismele reducătoare.

CONCLUZII

S-au studiat caracterele morfologice ale tulpinei ICCF 10 de *Eremothecium ashbyii*, precum şi fazele de dezvoltare în decursul procesului de biosinteză a riboflavinei.

Primul factor care influenţează producerea riboflavinei este variabilitatea excesivă a microorganismului. Potenţialul de biosinteză se poate menţine la un nivel ridicat, prin combinarea selecţionării tulpinilor active din coloniile puternic pigmentate, cu trecerile alternante pe medii de cultură de compoziţie diferită.

Folosirea unui material de însămînţare (inocul) vegetativ prezintă neajunsuri, dintre care cel mai important este creşterea pericolului de contaminare cu microorganisme străine în timpul manipulărilor. S-a realizat un inocul sporulat, pe mediu solid, conservabil şi utilizabil şi după 3 luni.

Pentru producerea industrială a riboflavinei s-a stabilit un mediu de cultură înalt productiv format din ingrediente uşor accesibile şi ieftine.

S-au stabilit condiţiile de sterilizare a mediului în fermentatoarele metalice pilot şi parametrii de fermentare.

O concentraţie ridicată de riboflavină în mediul de cultură se realizează cînd sînt păstraţi următorii parametri : suprapresiunea aerului în fermentator de 0,2 atm, debitul aerului insuflat de 0,25 l aer pe 1 litru mediu şi minut, temperatura de 28 $\pm$ 1°C, viteza agitării de 160 rot/min şi durata fermentaţiei de 5 zile.

S-a reexaminat compoziţia mediului de cultură în condiţiile de lucru din pilot.

În timpul fermentaţiilor pilot s-a urmărit variaţia azotului aminic, zahărului reducător, pH-ului şi acumularea riboflavinei. Variaţia pH-ului este caracteristică şi o abatere de la variaţia normală indică o contaminare a fermentaţiei cu bacterii.

Prin urmărirea conținutului de riboflavină extracelulară și totală (intra- și extracelulară), se poate stabili în mod precis încheierea procesului de biosinteză a riboflavinei.

S-a urmărit prin cromatografie pe hîrtie apariția riboflavinei în timpul biosintezei.

Riboflavina din mediile fermentate a fost izolată prin precipitare în urma reducerii sale cu hidrosulfit de sodiu la compuși insolubili. Înainte de precipitare mediile fermentate se clarifică prin tratare cu acid sulfuric pînă la pH 3—3,6 la 80°C, timp de 30 min, și apoi filtrare. Riboflavina precipitată se recristalizează din acid clorhidric 24% în prezență de perhidrol și din fenol.

S-au studiat condițiile de obținere a unui concentrat de riboflavină furajeră prin precipitare cu hidrosulfit de sodiu și prin reducere pe cale microbiologică.

Prezentată la redacție la 17 martie 1962

Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, București

ПОЛУЧЕНИЕ РИБОФЛАВИНА В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА

РЕЗЮМЕ

Повышенную способность к биосинтезу рибофлавина у штамма поддерживали комбинированием селекции высокопродуктивных штаммов сильно пигментированных колоний (метод Коха для выделения чистых культур микроорганизмов) с чередующимися переносами селекционированных штаммов на среды различного состава, в условиях перемешивания и без него. При развитии в среде, с доступом воздуха и при перемешивании — штамм Eremothecium ashbyii ICCF № 10 представляет пять стадий развития, характеризующихся морфологическими изменениями; цикл развития равен пяти дням.

Было установлено, что развившаяся на вылущенных зернах проса, сваренных в солодовом сусле, прививка спор может консервироваться продолжительное время, легко манипулируется, мало изменяется и дает при брожении большое содержание рибофлавина. Был найден рецепт промышленной высокопродуктивной среды для брожения, а также параметры брожения, подходящие для Eremothecium ashbyii ICCF № 10.

Во время брожения авторы наблюдали за изменением содержания аминного азота, восстанавливающих веществ, значения pH и образованием рибофлавина. Кривая значений pH характерна и отклонения от нее указывают на наличие инфекций. Была установлена технология получения рибофлавина из перебродивших сред.

В работе описана техника получения кормового концентрированного препарата витамина B_2 путем осаждения рибофлавина гидросульфатом или микробиологическим путем, с последующим фильтрованием и сушкой.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКА

Рис. 1. — Изменения pH, аминного азота, глюкозы и образование рибофлавина в течение однократного брожения.

PRODUCTION BIOSYNTHÉTIQUE DE LA RIBOFLAVINE

RÉSUMÉ

Pour maintenir à un niveau elevé la capacité de biosynthèse de la riboflavine chez la souche d'*Eremothecium ashbyii* ICCF n° 10 on a combiné la sélection de souches très productives provenant des colonies fortement pigmentées (par la méthode de Koch d'isolation en culture pure des microorganismes) avec les passages alternatifs des souches sélectionnées sur des milieux de culture de composition variée, agités et nonagités. Dans les milieux agités et aérés, la souche *Eremothecium ashbyii* ICCF n° 10 présente cinq phases de développement caractérisées par des modifications morphologiques, le cycle de développement étant de 5 jours.

On a établi qu'un inoculum sporulé développé sur des graines de millet décortiquées et cuites dans du moût de malt, peut se conserver pendant longtemps, est d'une manipulation aisée et d'une variabilité réduite et produit dans les fermentations de fortes teneurs en riboflavine. On a pu aussi établir la formule d'un milieu fermentatif industriel à haute productivité, ainsi que les paramètres de la fermentation valables pour *Eremothecium ashbyii* ICCF n° 10.

Au cours de la fermentation on a étudié la variation de l'azote aminique, celle des substances réductrices et celle du pH et la formation de la riboflavine. La courbe de la variation du pH est caractéristique et ses altérations indiquent l'apparition des infections. On a établi le processus technologique permettant d'obtenir la riboflavine à partir des milieux fermentés.

On décrit la technique de préparation d'un produit concentré en B_2 pour fourrages, par la précipitation de la riboflavine à l'aide du hydrosulfite ou par voie microbiologique, suivie de filtration et de séchage.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Variation du pH, de l'azote aminique et de la glucose et formation de la riboflavine au cours d'une fermentation.

BIBLIOGRAFIE

1. R. J. HICKEY, *Production of riboflavin by fermentation*, în *Industrial Fermentations*, edited by Leland A. Underkofler and Richard J. Hickey, Chemical Publishing Co, INC, New York, N. Y. 1954, **II**, 157.
2. M. HEROLD, J. NĚCÁSEK, *Protected Fermentation*, în *Advances in Applied Microbiology*, edited by Wayne W. Umbreit, Academic Press, New York, London, 1959, **I**, 1.
3. J. HOLLO, J. SZAMEL, L. NYESTE, R. TENGERDY, *Recherches sur la production de riboflavine à partir de résidus agricoles*, Industr. alim. agr. (Industries alimentaires et agricoles), 73e année, Juillet-Août, p. 519 (1956).
4. A. GUILLIERMOND, *Sur un champignon nouveau, parasite des capsules du cotonnier*, l'**Eremothecium ashbyii** *et ses relations possibles avec le* **Spermophthora gossypii** *et les* **Ascomycètes**, C. r. de l'Academie des Sciences-Mycologie, **200**, 1556 (1935).
5. E. M. DIKANSKAJA, *Formarea vitaminei B_2 de către ciuperca* **Eremothecium ashbyii**, Trudî Inst. Microbiol., **III** (1954).
6. N. H. MOORE, G. DE BECZE, *Riboflavin synthesis by* **Eremothecium ashbyii** *in synthetic and natural substrates*, **J. Bacter**, **54**, 40 (1947).
7. A. GUILLIERMOND, M. FONTAINE, A. RAFFY, *Sur l'existence dans* l'**Eremothecium ashbyii** *d'un pigment jaune se rapportand au groupe des flavines*, C. r. de l'Academie des Sciences, **201**, 1077 (1935).
8. W. H. SCHOPFER, M. GUILLOUD, SCHWEIZ, Z. Path. u. Bakt., **8**, 521 (1945).
9. SHINJI DOI, KAZNO TSUBONCHI, *Riboflavine production by* **Eremothecium ashbyii**, J. Ferment. Technol. Japan, **32**, 167 (1954).
10. KAZUNORI, TSUCHIARA, MASAKAZU, IZUMIYA, *Industrial production of riboflavine by the submerged culture of* **Eremothecium ashbyii**, Vitamins (Japan), **10**, 434 (1956); **11**, 389, 393, 398 (1956); **12**, 24 (1957).
11. MAZUDA, Tom. Pharmac. Bull., **5**, 136 (1957).
12. R. KUHN, R. STROBELL, *Über verdo-chloro und rhodo-flavine*, Ber., **70**, 763 (1937); **67** (b), 361 (1934).
13. G. E. HINES, Patent U.S.A., *2367*, 644 (1945).
14. R. J. HICKEY, J. Arch. Biochem., **11**, 259 (1946).
15. К. С. ПОВОЛОЦКАЯ, Н. А. ВОДОЛАЦКАЯ, *Химические и микробиологические методы определения рибофлавина в растительных продуктах*.. Труды, Всесоюзный Научно-Исследовательский Витаминый Институт, Москва, *4*, 217—26 (1953).
16. J. K. DALE, Patent U.S.A., *2815341*, C. A., 4116 g (1958).
17. В. М. БЕРЕЗОВСКИЙ, *Синтетическое получение витамина* B_2. Журнал, Прикладной Химии, **22**, 527 (1949).

LOCALIZAREA ACTIVITĂȚII AMILAZEI ȘI INVERTAZEI PE FRACȚIUNILE PROTEICE SOLUBILE DIN SEMINȚELE DE PORUMB ÎN TIMPUL ÎNCOLȚIRII

DE

VICTORIA ALEXANDRESCU

În timpul încolțirii semințelor de porumb metabolismul crește brusc pentru a furniza energia și materialul necesar creșterii germenului. Dacă încolțirea are loc prin imbibiția semințelor cu apă distilată, și plantula crește la întuneric (pentru evitarea aportului substanțelor din exterior), determinările cantitative ale substanțelor de bază ca: amidon, mono- și dizaharide, ulei, celuloză, hemiceluloză, arată schimbarea cantității în urma încolțirii, pe cînd substanțele proteice, substanțele minerale rămîn cantitativ aceleași [1], [2].

În timpul încolțirii însă, activitatea enzimatică crește mult, ceea ce arată că substanțele proteice suferă în structura lor modificări care le aduc proprietăți noi. Aceasta ne-a determinat să cercetăm separarea proteinelor din semințele de porumb, înainte și după încolțire, cu ajutorul electroforezei pe hîrtie, pentru a cerceta localizarea activității unor enzime pe fracțiunile obținute, în vederea găsirii unei posibilități de apreciere a transformărilor pe care proteinele le suferă în procesul germinației.

Printre enzimele a căror activitate crește foarte mult la încolțire sînt și amilazele și invertaza.

Cercetarea localizării activității enzimelor pe fracțiunile proteice s-a făcut pînă acum mai mult pe proteine de proveniență animală, cum sînt de exemplu proteinele serice [3], [4], [5], cele hepatice [6], [7] și cele din mitocondriile de ficat și creier de șobolan [8]. În ceea ce privește proteinele vegetale, cercetările sînt la început și au fost făcute prin fracționare chimică. Menționăm de exemplu, cercetările lui V. L. Kretovici și colaboratori [9], care au cercetat activitatea enzimatică a proteinelor din semințele de mazăre și au dovedit că proteinele de rezervă ale plantelor posedă funcțiuni enzimatice și nu reprezintă un material inert;

apoi cercetările efectuate de M. I. Smirnova-Ikonnikova și E. P. Veselova [10] care susțin că la plantele monocotiledonate (porumb) proteinele active sînt concentrate în embrion, pe cînd endospermul conține enzime în stare inactivă. Această concluzie nu este confirmată însă de cercetările noastre [11]. Autorii au lucrat la diluții mult prea mari și probabil că din această cauză au ajuns la asemenea concluzii.

Proteinele solubile din semințele de porumb au fost cercetate de J. F. Foster și colaboratori [12] și de E. T. Mertz și colaboratori [13] prin electroforeză în mediu lichid. În literatura consultată nu am găsit indicată fracționarea proteinelor din semințele de porumb prin electroforeză pe hîrtie, iar într-o lucrare anterioară am publicat datele în legătură cu separarea fracțiunilor proteice solubile din germenul și endospermul de porumb ICAR 54 și am stabilit localizarea activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice obținute [11].

Separarea electroforetică a proteinelor în timpul încolțirii nu am găsit-o indicată în literatură. În lucrarea de față s-a cercetat separarea, cu ajutorul electroforezei pe hîrtie, a proteinelor solubile din germenul și din endospermul de porumb în timpul încolțirii, precum și localizarea activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice obținute.

Germinarea semințelor s-a făcut prin îmbibarea lor timp de 5—6 ore cu apă distilată conținînd $1^0/_{00}$ formol și apoi menținerea lor în cutii Petri la întuneric, păstrîndu-se umezeala necesară creșterii germenului.

Extragerea proteinelor solubile din endosperm și germen în timpul încolțirii, electroforeza și determinarea activității amilazei și invertazei s-au efectuat în aceleași condiții ca și în lucrarea precedentă [11], pentru ca datele obținute să fie comparabile (extracția din germen s-a făcut în acest caz folosind raportul de extracție 1g/1 ml).

Probele s-au luat din două în două zile, pînă în ziua a zecea de germinare. S-a lucrat separat pe endosperm și germen (vîrful de creștere + rădăcina embrionară și cele primare). Sămînța de porumb luată după două (uneori trei) zile de la imbibiție, în funcție de temperatura la care germinează, prezintă un germen care de-abia a spart învelișul bobului și are o lungime a vîrfului de creștere de aproximativ 0,5 cm, plus rădăcina embrionară. Celelalte probe prezintă germeni care au vîrful de creștere de minimum 1 cm lungime plus rădăcina embrionară și cele primare.

Electroforeza pe hîrtie a extractului proteic din endospermii și germenii semințelor de porumb după 2—3 zile de la imbibiția cu apă dă electroforegrame neclare în condițiile noastre de lucru. Nu se pot delimita fracțiunile proteice, ceea ce ar arăta o transformare în privința mobilității lor. Este, după cum se pare, perioada de transformare a proteinelor din sămînță în proteinele specifice funcțiilor ce le au de îndeplinit în procesul încolțirii. Cu cît separarea germenului de endosperm se face într-o fază mai apropiată de starea de neîncolțire, cu atît se pot întrevedea mai bine fracțiunile proteice caracteristice germenului și endospermului seminței de porumb neîncolțite, iar cînd germenul este separat de endosperm după ce el trece de 0,5 cm (fără rădăcină), se pot întrevedea pe electroforegrame fracțiunile proteice caracteristice germenului și endospermului seminței de porumb încolțite cu un germen de minimum 1 cm

(fără rădăcină). Începînd de la această fază şi pînă într-a zecea zi, cînd germenul atinge lungimea de 5—6 cm, însă frunzele nu au ieşit din teacă, electroforegramele substanţelor proteice solubile ale endospermilor şi germenilor prezintă aceleaşi fracţiuni.

Electroforeza pe hîrtie a extractelor proteice din *endospermii* semînţelor de porumb ICAR 54 încolţite între a 4-a şi a 10-a zi de la imbibiţie arată, în condiţiile noastre de lucru, prezenţa a 5 fracţiuni. Timpul de migrare la electroforeză a fost de 9 ore, ca şi în cazul semînţelor neîncolţite.

Fracţiunile le-am denumit cu literele mari ale alfabetului însoţite de semnul ′ (prim), pentru a le deosebi de fracţiunile obţinute din endospermii semînţelor neîncolţite. Ele s-au notat deci de la A' la E', în ordinea migrării, A' fiind fracţiunea cea mai apropiată de start, cu mobilitatea $0{,}66 \cdot 10^{-5}$ cm²/s/V, iar E' fracţiunea cea mai depărtată, cu mobilitatea $2{,}03 \cdot 10^{-5}$cm²/s/V. În tabela 1 sînt date, pentru orientare, valorile procentuale relative ale fracţiunilor proteice din endospermii la care germenii

Tabela 1

Procentul relativ şi mobilitatea fracţiunilor proteice din endospermul de porumb între a 4-a şi a 10-a zi de la imbibiţie

(X = valoarea dată în tabelă)

Denumirea fracţiunilor	A'	B'	C'	D'	E'	Partea frontală
Procentul relativ	28	18	19	18	12	5
Mobilitatea x. 10^{-5} cm²/s/V	0,66	0,98	1,23	1,58	2,03	—

aveau aproximativ 3 cm lungime, precum şi mobilităţile lor, iar în figura 1 sînt date, în paralel, spre exemplificare, o electroforegramă obţinută cu extract proteic din endosperm înainte şi una după încolţire.

Examinînd valorile mobilităţilor fracţiunilor proteice obţinute din endosperm după încolţire, se constată că ele sînt identice cu cele obţinute la endospermul neîncolţit [11], fapt care arată că fracţiunile proteice din endosperm nu se schimbă din punct de vedere calitativ (sarcini electrice) în timpul încolţirii. Totuşi substanţele proteice suferă anumite transformări, deoarece se modifică repartiţia procentuală pe fracţiuni (tabela 1), cît şi aspectul lor pe electroforegrame (fig. 1): de exemplu, fracţiunea B' este foarte strînsă ca întindere a proteinei, iar fracţiunea E' de-abia se poate observa fiind doar ca urme de proteină. Aceasta reiese şi din faptul că în faza iniţială de încolţire nu se obţine pe electroforegrame o repartizare clară a proteinelor, în fracţiuni.

Electroforeza pe hîrtie a extractului proteic din *germenii* semînţelor de porumb ICAR 54 încolţite între a 4-a şi a 10-a zi de la imbibiţie arată, în condiţiile noastre de lucru, prezenţa a trei fracţiuni proteice. În acest caz, timpul de migrare la electroforeză s-a redus la 4 ore, de la 9 ore cît a fost în cazul semînţelor neîncolţite. Fracţiunile le-am denumit cu literele mici ale alfabetului, însoţite de semnul ′ (prim), pentru a le deosebi de fracţiunile obţinute din germenii semînţelor neîncolţite, a' fiind fracţiunea cea mai apropiată de start, b' a doua şi d' a treia. Nu am notat

fracțiunea a treia cu c', deoarece între fracțiunile b' și d' este un interval de aproximativ 1 cm, unde totuși se găsește o cantitate destul de mare de proteină fără a forma o fracțiune distinctă și pe care am notat-o cu litera c'. Valorile procentuale relative și mobilitățile acestor fracțiuni sînt date în tabela 2.

Tabela 2

Procentul relativ și mobilitatea fracțiunilor proteice din germenul de porumb între a 4-a și a 10-a zi de la imbibiție

(x = valoarea dată în tabelă)

Denumirea fracțiunilor	a'	b'	Spațiul c'	d'	Partea frontală
Procentul relativ	44	22	12	14	8
Mobilitatea x. 10^{-5} $cm^2/s/V$	0,98	2,36	(3,15)	3,94	—

În figura 2 sînt date în paralel, spre exemplificare, electroforegrame obținute cu extract proteic din germen înainte și după încolțire.

Examinînd valorile mobilităților fracțiunilor proteice obținute, se constată că fracțiunea a' prezintă practic aceeași mobilitate cu fracțiunea a de la germenul neîncolțit (0,98 și 1,08 $\cdot 10^{-5}$ $cm^2/s/V$) ceea ce arată că ele sînt foarte asemănătoare sau identice din punct de vedere al comportării electroforetice, pe cînd celelalte fracțiuni, b' și d', posedă o mobilitate crescută, ceea ce arată că în procesul încolțirii moleculele proteinelor devin mai încărcate cu sarcini electrice.

Se constată că numărul fracțiunilor proteice scade de la patru la trei.

În ceea ce privește fracțiunile proteice separate din endospermul și germenul de porumb ICAR 54, înainte și după încolțire, analizînd valorile mobilităților lor electroforetice, se constată prezența unei fracțiuni proteice asemănătoare sau identice din punct de vedere al sarcinilor electrice a moleculelor respective, și anume fracțiunea notată — după caz — cu B, a, B', a'. Aceasta ar pleda pentru existența, în endospermul și germenul semințelor de porumb, a unor proteine comune care se păstrează și după încolțire.

Localizarea activității amilazei și invertazei din endosperm și germen nu s-a putut cerceta în perioada de început a germinației, deoarece nu se puteau delimita fracțiunile proteice pentru eluarea enzimelor și determinarea activității lor. Începînd din a 4-a zi de la îmbibarea semințelor cu apă, cînd extractele proteice dădeau electroforegrame cu fracțiuni proteice bine delimitate, s-a putut cerceta și localizarea activității acestor două enzime.

În cazul extractelor din endospermii încolțiți, s-a constatat că electroforegramele conțin o activitate mult crescută a amilazei și invertazei față de activitatea corespunzătoare din semințele neîncolțite. Astfel, acum a trebuit micșorat numărul electroforegramelor eluate, de la două la una pentru amilază și de la trei la una pentru invertază, și dublată cantitatea de reactivi pentru determinarea substanțelor reducătoare (4 ml fericianură de potasiu în loc de 2 ml).

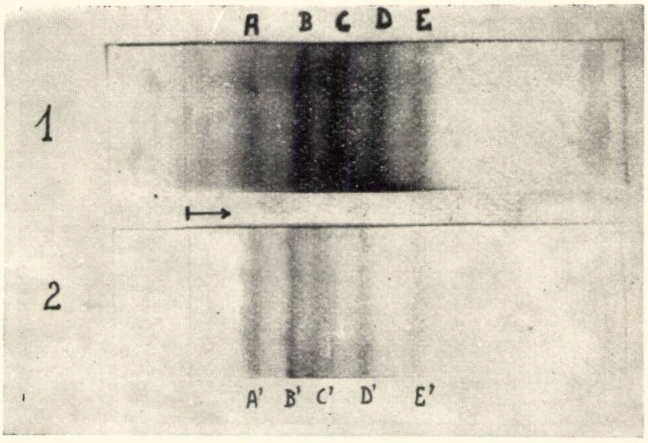


Fig. 1. — Electroforegramele proteinelor solubile din endospermul semințelor de porumb înainte și după încolțire.
1 — neîncolțit; 2 — încolțit.

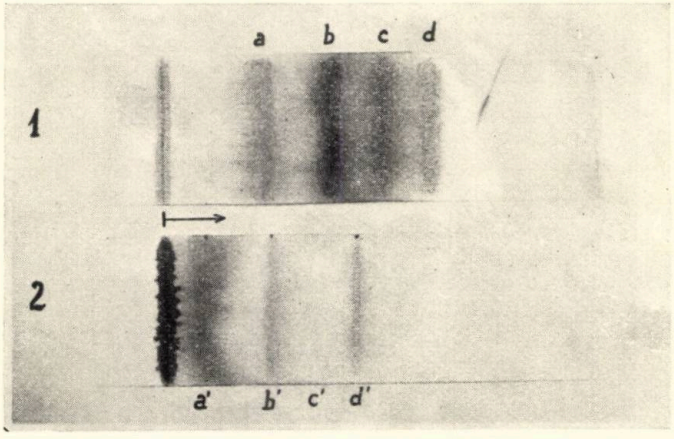


Fig. 2. — Electroforegramele proteinelor solubile din germenul semințelor de porumb înainte și după încolțire.
1 — neîncolțit; 2 — încolțit.

În cazul extractelor din germenii încolțiți, creșterea activității celor două enzime este mai mică. Pentru determinarea activității amilazei sau invertazei, s-a folosit eluția de pe două electroforegrame, în loc de patru cîte erau necesare în cazul semințelor neîncolțite, cantitatea de reactivi pentru determinarea substanțelor reducătoare rămînînd aceeași (2 ml fericianură de potasiu).

Cercetarea localizării activității amilazei și invertazei din *endospermul* semințelor încolțite pe fracțiunile proteice obținute prin electroforeza pe hîrtie arată, după cum reiese din tabela 3, că activitatea acestor

Tabela 3

Repartiția activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice solubile din endospermul de porumb, între a 4-a și a 10-a zi de la imbibiție

(Rezultatele sînt date în ml tiosulfat de sodiu N/100

Enzima	Start	A'	B'	C'	D'	E'	Partea frontală
Amilază	0,30	5,00	2,80	0,45	0,95	1,70	0
Invertază	0	4,20	2,25	0,10	0,35	0,70	0

două enzime se află pe fracțiunile A', B' și E'. La fracțiunea A' cantitatea de substanțe reducătoare care s-a format a redus cea mai mare cantitate de fericianură de potasiu existentă în reacție, fracțiunea B' posedă circa jumătate din activitatea fracțiunii A', iar pe fracțiunea E' activitatea acestor două enzime este totdeauna mai mare decît pe fracțiunea D', ceea ce ar pleda pentru existența unei amilaze și invertaze și pe această fracțiune.

Făcînd o comparație cu datele obținute în lucrarea precedentă pe endospermul de porumb neîncolțit, constatăm că în timpul încolțirii activitatea amilazei și invertazei din endosperm crește mult. După încolțire activitatea celor două enzime se găsește localizată pe trei fracțiuni proteice, aceleași cu cele obținute din endospermul neîncolțit. Deosebirea constă doar în faptul că pe cînd la endospermul neîncolțit activitatea maximă a celor două enzime o avea fracțiunea B, după încolțire activitatea maximă este localizată pe fracțiunea A', deci creșterea activității nu este identică pe toate cele trei fracțiuni proteice.

Cercetarea localizării activității amilazei și invertazei din *germenul* încolțit pe fracțiunile proteice obținute prin electroforeza pe hîrtie, arată — după cum reiese din tabela 4 — că atît amilaza cît și invertaza sînt locali-

Tabela 4

Repartiția activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice solubile din germenul de porumb, între a 4-a și a 10-a zi de la imbibiție

(Rezultatele sînt date în ml tiosulfat de sodiu N/100)

Enzima	Start	a'	b'	spațiul c'	d	Partea frontală
Amilază	0	3,50	1,10	2,70	0,65	0
Invertază	0	2,55	0,60	0,30	0,80	1,60

zate pe cîte două fracțiuni. Astfel activitatea amilazei este localizată pe fracțiunile a' și spațiul dintre fracțiunile proteice b' și d', denumit c', iar activitatea invertazei pe fracțiunea a' și pe partea frontală a electroforegramei. Ca și în cazul endospermului, localizarea activității enzimatice nu este absolut strictă pe aceste fracțiuni, ci se găsește ca urme și pe fracțiunile învecinate. Făcînd o comparație cu datele obținute în lucrarea precedentă, pe germen de porumb neîncolțit, constatăm că în timpul încolțirii activitatea amilazei și invertazei din germen crește destul de mult, însă creșterea este mai mică în comparație cu a endospermului. Activitatea celor două enzime este repartizată tot pe două fracțiuni, distanțate între ele. Una este fracțiunea proteică a', care posedă aceeași mobilitate electroforetică cu fracțiunea a de la germenul neîncolțit, iar a doua posedă o mobilitate crescută. Astfel, a doua amilază care se localizează în spațiul c' ar avea mobilitatea de $3{,}15.10^{-5}$ cm^2/s/V în loc de $1{,}82.10^{-5}$ cm^2/s/V, iar invertaza $>3{,}94.10^{-5}$ cm^2/s/V în loc de $>2{,}20.10^{-5}$cm^2/s/V. Aceasta ne arată că moleculele celor două enzime se schimbă din punct de vedere al mobilității electrice, devenind mai încărcate cu sarcini electrice. Privind pe electroforegrame (fig. 2) repartiția celor două enzime, sîntem tentați de a face ipoteza că în timpul încolțirii proteinele de pe fracțiunea a' nu s-ar schimba, cele de pe fracțiunea c ar suferi în majoritatea lor transformări mai profunde, iar restul ar suferi în masă modificări care ar duce la mărirea mobilității lor.

În concluzie, prin datele obținute în această lucrare, s-au adus contribuții la cunoașterea proteinelor și a localizării activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice din endospermul și germenul seminței de porumb în timpul încolțirii.

Electroforegramele extractului proteic din endosperm și germen în timpul încolțirii sînt la început neclare. După ce germenul (fără rădăcină) trece de 0,5 cm, se obțin electroforegrame clare, și anume în cazul endospermului apar 5 fracțiuni proteice, care după mărimea mobilității electrice sînt aceleași cu cele ale endospermului neîncolțit, iar în cazul germenului se obțin trei fracțiuni proteice, în loc de patru fracțiuni cum se obțin din germenii neîncolțiți. Valorile mobilităților electroforetice arată că prima fracțiune a' se găsește și în cazul germenului neîncolțit, pe cînd celelalte fracțiuni proteice își măresc mult mobilitatea lor.

Activitatea amilazei și invertazei din endosperm crește mult în timpul încolțirii și este localizată pe trei fracțiuni proteice, care sînt aceleași ca și în cazul endospermului neîncolțit. Creșterea activității nu este însă uniformă pe toate fracțiunile, ci în special pe fracțiunea A'. În cazul germenului, activitatea amilazei și invertazei este localizată pe două fracțiuni : amilaza pe fracțiunea a' și spațiul c', iar invertaza pe fracțiunea a' și partea frontală a electroforegramei.

Comparînd mobilitățile electrice ale fracțiunilor proteice obținute din endosperm și germen, înainte și după încolțire, se constată că există o fracțiune proteică comună, notată după caz cu B, a, B', a', care prezintă aceeași mobilitate electrică. Pe această fracțiune este localizată o parte din activitatea amilazei și invertazei. După încolțire, o parte din amilaza și invertaza germenului prezintă o mobilitate crescută. Urmează să

lămurim mai îndeaproape, pe alte căi, transformările pe care le suferă substanţele proteice din germen după încolţire în general, şi cele două enzime în special, care se comportă diferit din punctul de vedere al mobilităţii lor.

Prezentată la redacţie la 25 aprilie 1962

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
Bucureşti

ЛОКАЛИЗАЦИЯ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ И ИНВЕРТАЗЫ В РАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЯХ СЕМЯН КУКУРУЗЫ ВО ВРЕМЯ ПРОРАСТАНИЯ

РЕЗЮМЕ

В начальной стадии прорастания семян электрофореграммы белкового экстракта эндосперма и зародыша неясны. После того, как зародыш (без корня) достигает больше 0,5 см, получаются ясные электрофореграммы; для эндосперма получается пять белковых фракций, которые по значению электроподвижности совпадают с фракциями не проросшего эндосперма; для зародыша получается три белковых фракций вместо четырех, соответствующих непроросшим зародышам. Значения электрофоретической подвижности показывают наличие первой фракции *a* и в случае непроросшего зародыша, тогда как подвижность других белковых фракций значительно возрастает.

Активность амилазы и инвертазы эндосперма сильно повышается во время прорастания и локализуется в трех белковых фракциях, тех же, что и в случае непроросшего эндосперма. Для зародыша активность амилазы и инвертазы локализуется в двух фракциях: амилаза в фракции *a'* и пространстве *c'*, а инвертаза в фракции *a'* и фронтальной части электрофореграммы.

Было установлено, что существует общая белковая фракция, обозначенная в различных случаях *B*, *a*, *B'*, *a'*, обладающая одинаковой электрофоретической подвижностью. В этой фракции локализирована часть активности амилазы и инвертазы. После прорастания часть амилазы и инвертазы зародыша обладает повышенной подвижностью.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Электрофореграммы растворимых белков эндосперма семян кукурузы до и после прорастания. *1* — непроросший: *2* — проросший.

Рис. 2. — Электрофореграммы растворимых белков зародыша семян кукурузы до и после прорастания. *1* — непроросший; *2* — проросший.

LOCALISATION DE L'ACTIVITÉ DE L'AMYLASE ET DE L'INVERTASE SUR LES FRACTIONS PROTÉIQUES SOLUBLES DES GRAINES DE MAÏS PENDANT LA GERMINATION

RÉSUMÉ

Dans la phase initiale de la germination des graines, les électrophorégrammes de l'extrait protéique de l'endosperme et du germe ne sont pas très claires. Lorsque le germe (moins la racine) a dépassé 0,5 cm, on obtient des électrophorégrammes clairs : dans le cas de l'endosperme on obtient 5 fractions protéiques — identiques par la grandeur de leur mobilité électrique, à celles de l'endosperme non germé — et dans le cas du germe, 3 fractions protéiques au lieu des 4 qu'on obtient des germes non germés. Les valeurs de la mobilité électrophorétique montrent que la première fraction a' se retrouve dans le cas du germe non germé, tandis que les autres fractions protéiques ont une mobilité très accrue.

L'activité de l'amylase et de l'invertase de l'endosperme augmente beaucoup pendant la germination et se trouve localisée dans trois fractions protéiques qui sont les mêmes que dans le cas de l'endosperme non germé. Dans le cas du germe, l'activité des deux enzymes est décelable dans deux fractions : l'amylase dans la fraction a' et dans l'espace c', et l'invertase dans la fraction a' et dans la partie frontale de l'électrophorégramme.

On constate qu'il existe une fraction protéique commune, notée respectivement B, a et B', a', qui présente la même mobilité électrique. C'est dans cette fraction que se trouve localisée l'activité de l'amylase et de l'invertase. Après la germination, une partie de l'amylase et de l'invertase du germe présente cependant une mobilité accrue.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Electrophorégrammes des protéines solubles de l'endosperme des graines de maïs avant et après la germination.

1 = non germées ; 2 = germées.

Fig. 2. — Electrophorégrammes des protéines solubles du germe des graines de maïs avant et après la germination.

1 — non germées ; 2 = germées.

BIBLIOGRAFIE

1. B. Крокер, Л. Бартон, *Физиология семян*, Изд. ин. лит. Москва, 1955.
2. P. M. Jukovschi, *Botanica*, Ed. şt., Bucureşti, 1953, 107.
3. R. L. Mc Geachin, J. P. Lewis, *Electrophoretic behaviour of serum amylase*, J. Biol. Chem., **234**, 795 (1959).
4. M. Sevela, *Determination of transaminase activity of serum protein fractions separated by paper electrophoresis*. Nature, **181**, 915 (1958).
5. G. Pellegrino, R. Carayaglios, *Studio elettroforetico delle proteine solubili della cellula epatica e di alcuni enzimi in esse contenuti*, Arch. Sci. biol. Ital., **41**, *3*, 233 (1957).

6. W. O. WOLFSON, *Location of alpha-2-globulin by demonstration of alkaline phosphatase, during paper electrophoresis*, Nature, G. B., **180**, *4585*, 550 (1957).
7. D. NACHKOV, O. NACHKOVA, *Étude électrophorétique, immunologique et enzymatique des protéines hépatiques chez la souris*, Bull. Soc. Chim. Biol., **41**, *1*, 159 (1959).
8. C. ŞELARIU, S. MIHĂESCU, *Repartiţia transaminazelor pe fracţiunile electroforetice ale proteinelor solubile din mitocondriile de creier şi ficat de şobolan*, Studii şi cercet. de biochimie, **V**, *1*, 97 (1962).
9. В. Л. КРЕТОВИЧ, А. А. БУНДЕЛ, С. С. МЕЛИК-САРКИСЯН, К. М. СТЕПАНОВИЧ, *О так называемых запасных белках семян*, Биохимия, **19**, 208 (1954).
10. М. И. СМИРНОВА-ИКОННИКОВА, Е. П. ВЕСЕЛОВА, *Ферментные свойства белковых фракций семян зерновых бобовых культур*, ДАН СССР, **120**, *4*, 849 (1958).
11. V. ALEXANDRESCU, *Localizarea activităţii amilazei şi invertazei pe fracţiunile proteice solubile din seminţele de porumb*, Studii şi cercet. de biochimie, **V**, *1*, 7 (1962).
12. J. F. FOSTER, J. T. YANG, N. H. YUI, *Extraction and electrophoretic analysis of the proteins of corn*, C. A., **45**, 2110 i (1951).
13. E. T. MERTZ, N. E. LLOYD, R. BRESSANI, *Studies on corn proteins. II. Electrophoretic analysis of germ and endosperm extracts*, Cereal Chem., **35**, *2*, 146 (1958).

ELECTROFOREZA ȘI IMUNODIFUZIA PROTEINELOR ÎN GEL DE AGAROZĂ

DE

VICTOR GHEȚIE și DAN MOȚET-GRIGORAȘ

Gelul de agar este utilizat în prezent pe scară largă ca mediu de suport pentru electroforeza și imunoelectroforeza proteinelor [1].

Agarul este un polizaharid acid. Din cauza grupărilor acide încărcate electric, în timpul electroforezei ia naștere un curent puternic de electroendosmoză și are loc adsorbția substanțelor bazice, ceea ce constituie principalul dezavantaj al gelului de agar.

Agarul nu este însă un compus unitar, fiind format din două polizaharide distincte : agaropectina și agaroza [2]. Agaroza este elementul principal, constituit din resturi de 3,6 — anhidro L — galactoză și D—galactoză, legate alternativ. Agaroza nu conține deci grupări acide, de aceea a fost utilizată de S. Hjertén ca mediu de suport pentru electroforeză și imunoelectroforeză [3], [4]. Folosind gelul de agaroză, acest autor a constatat o scădere considerabilă atît a curentului de electroendosmoză, cît și a adsorbției unor proteine, a unor compuși micromoleculari și a cristalvioletului. Prin imunodifuzie s-au format în gelul de agaroză linii de precipitare mai clare ca în gelul de agar, eliminîndu-se haloul și falsele linii de precipitare [4].

Pe lîngă aceste precizări, era însă important de stabilit dacă se îmbunătățește capacitatea de rezoluție electroforetică a gelului de agaroză în raport cu gelul de agar. Absența grupărilor acide din molecula agarozei ar putea avea repercusiuni nu numai asupra electroendosmozei și adsorbției, ci și asupra structurii interne a gelului. De asemenea, îndepărtarea agaropectinei poate conferi gelului proprietăți fizico-chimice noi.

Există deci premise ca agaroza să posede o capacitate de rezoluție electroforetică mai mare decît agarul. Acesta cu atît mai mult cu cît există o asemănare structurală evidentă între agaroză și amidon și deci nu este exclus ca gelurile formate de aceste substanțe să aibă proprietăți similare, prezentînd o putere de rezoluție electroforetică superioară agarului [5].

Ne-am propus să verificăm presupunerile noastre comparînd capacitatea de rezoluție electroforetică a gelurilor de agar, agaroză și amidon. În această lucrare prezentăm numai datele obținute din comparația agar-agaroză. Ca material de analiză s-au folosit substanțe proteice.

Agaroza a fost obținută din agar, folosind metoda C. Araki în varianta descrisă de S. Hjertén [3]. S-a folosit un agar pro analisi (Chemische Fabrik Erich Nickel, Heidelberg) conținînd 10% apă. S-a procedat astfel: 15 g agar tăiat mărunt s-au dispersat într-un amestec format din 170 ml piridină și 20 ml apă distilată. După 24 de ore s-a adăugat picătură cu picătură 150 ml anhidridă acetică. Vasul în care s-a efectuat acetilarea s-a răcit pentru ca temperatura amestecului să nu depășească 70°C. Acetilarea a fost continuată la această temperatură încă 10 ore. Soluția vîscoasă de agar acetilat s-a picurat apoi într-un vas umplut cu 5 l apă distilată, răcită la 10—15°C. În timpul acestei operații apa a fost agitată puternic cu ajutorul unui motor. Precipitatul alb s-a filtrat și spălat pe filtru, în cîteva rînduri, cu apă distilată după care a fost mojarat și dispersat în apă distilată, în care s-a lăsat apoi 24 de ore. A doua zi precipitatul s-a spălat de două ori cu apă distilată, alcool etilic absolut și eter etilic. Agarul acetilat uscat s-a introdus într-o pîlnie de separare și s-a scuturat intermitent, 2—3 ore, cu 500 ml cloroform. Agaroza acetilată se solubilizează și se concentrează în stratul inferior, care s-a decantat după 24 de ore; operația a fost repetată încă de 3 ori, folosind 250 ml de fiecare dată. Extractele cloroformice reunite s-au filtrat la vid, pînă la clarificare. S-au adăugat apoi treptat 1250 ml eter de petrol, sub agitare violentă. Precipită agaroza acetilată. Ea s-a spălat succesiv cu eter de petrol și alcool etilic absolut. Precipitatul, încă umed, a fost reluat în 100 ml hidroxid de potasiu M în alcool etilic absolut. Desacetilarea s-a făcut la întuneric, sub agitare, timp de 24 de ore. Conținutul s-a neutralizat apoi cu acid acetic 20%. Controlul pH-ului a fost efectuat într-o probă alicotă, cu hîrtie indicatoare. Agaroza s-a spălat apoi de cîteva ori cu alcool absolut și s-a uscat cu eter etilic. S-a obținut o pulbere albă ce se dizolva ușor în apă caldă, formînd prin răcire geluri perfect transparente, cu o rigiditate asemănătoare agarului. La toate determinările s-a folosit aceeași concentrație de agar și agaroză (1,5 g%).

Analizele electroforetice s-au efectuat la temperatura camerei, folosindu-se o cădere de potențial de 22 V/cm, timp de 5—6 ore. Intensitatea curentului nu a depășit în nici o determinare 1,2 mA/cm. Imunoelectroforeza s-a efectuat după metoda dată de P. Grabar și C. A. Wiliams [6] folosind un ser de iepure imun antiom, cu titrul ridicat (1/20 000). Difuzia în gel s-a făcut după metoda O. Ouchterlony [7] la temperatura camerei.

S-au folosit următoarele tampoane: tamponul veronal-veronal sodic pH = 8,6; μ în cuvă = 0,05; μ în gel = 0,017; tamponul Tris *) -EDTA- borat [8] pH = 8,9, μ în cuvă = 0,04, μ în gel = 0,013; tamponul borat-fosfat [9] pH = 7,6, concentrația acidului boric în cuvă de 0,28 M, iar în gel de 0,08 M.

*) Tris = tris-(hidroximetil)-amino-metan; EDTA = acid etilendiamintetraacetic.

Substanțele proteice de origine animală au fost extrase din ficatul, creierul, plămînul și splina de iepure, ca și din splina de șobolan, folosind ca extractant tamponul fosfat M/15 de pH = 7,0. S-a folosit un raport de extracție de 1 parte organ/2 părți tampon. După omogenizare, s-a centrifugat extractul la 15 000 g, supernatantul limpede fiind supus analizei electroforetice.

Proteinele vegetale s-au extras din cotiledoanele și frunzele de bob (*Vicia faba*). Proteinele din cotiledoane s-au extras cu tamponul borat-fosfat amintit mai sus, în raport de extracție 1 parte făină/5 părți tampon. Omogenatul s-a limpezit prin centrifugare la 11 800 g. Proteinele foliare s-au extras cu un amestec format din acid boric 0,28 M, hidroxid de sodiu 0,04 M, fosfat monopotasic 0,01 M, glucoză 1 M, sulfit de sodiu 0,1 M și mertiolat 0,005 M. Raportul de extracție a fost de 1 parte frunză/0,25 părți extractant. După mojararea frunzelor cu nisip de cuarț și extractant, s-a trecut omogenatul printr-un tifon și a fost limpezit prin centrifugare la 11 800 g.

Experiențele au confirmat datele lui S. Hjertén, care constată că în agaroză curentul de electroendosmoză suferă o importantă micșorare. Astfel, folosind ca substanță indicatoare creatinina [10], s-a determinat pentru agaroză o viteză a curentului de electroendosmoză aproximativ de 3 ori mai mică decît pentru agar, indiferent de natura tamponului folosit (v. tabela).

Tabelă

Viteza curentului de electroendosmoză în gelul de agar și agaroză

Tamponul	Viteza curentului de electroendosmoză ($\times 10^{-5}$ cm^2/V/s)	
	Agar	Agaroză
Veronal-veronal sodic	1,29	0,45
Borat-fosfat	1,16	0,43

Reducerea curentului de electroendosmoză are o consecință practică importantă. În gelul de agaroză probele de analizat nu trebuie așezate în mijlocul plăcii, așa cum se procedează pentru agar, ci se pot aplica la unul din capetele ei. Se mărește astfel pista de migrare, ceea ce permite ca prin creșterea corespunzătoare a duratei electroforezei să se obțină separări mai înaintate.

Trebuie să precizăm însă că în experiențele prezentate în această lucrare nu am folosit această nouă posibilitate de creștere a puterii de rezoluție electroforetică, deoarece, în primul rînd, am urmărit să stabilim diferențele dintre capacitatea de rezoluție a acestor geluri atunci cînd analizele se efectuează în condiții absolut similare. În acest fel, gradul separărilor electroforetice erea cauzat doar de diferențele care existau între structura și proprietățile fizico-chimice ale gelurilor.

În afară de electroendosmoză și adsorbție ridicată, agarul mai prezintă și un alt inconvenient : deformarea gelului în timpul electro-

forezei [6]. După terminarea analizei, gelul nu se mai găsește uniform așezat pe placă, mai ales spre polul pozitiv, unde se află întotdeauna o zonă în care gelul este considerabil subțiat. Aceste deformări ale gelului, cauzate probabil de încărcarea electrică a agarului, nu se mai observă deloc sau în foarte mică măsură la agaroză. Acest fapt este important mai ales pentru analiza imunoelectroforetică, unde este necesar ca șanțurile pentru serul imun să aibă aceeași înălțime, asigurînd o repartizare uniformă a anticorpilor.

Cercetarea comparativă a capacității de rezoluție electroforetică a celor două geluri am efectuat-o folosind ca material de analiză serul sangvin uman normal și extracte proteice tisulare de origine animală și vegetală

Serul uman normal analizat în tampon veronal-veronal sodic prezintă un grad mai mare de heterogenitate dacă este analizat pe gel de agaroză (fig. 1). Se evidențiază astfel fracțiunea prealbuminică semnalată mai ales pe gel de amidon [5]. Fracțiunea α_1-globulinică, care nu apare clar pe gelul de agar, este bine delimitată pe agaroză. În agaroză se subfracționează de asemenea și α_2-globulinele. În sfîrșit, în ambele geluri se obțin două β-globuline. Făcînd suma fracțiunilor, se constată că în timp ce pe agaroză se pot identifica 8 componente proteice, în agar nu se separă clar decît 5 fracțiuni. Această deosebire apare și mai pregnant dacă se folosește tamponul Tris-EDTA-borat (fig. 1).

În aceste condiții, în agar se evidențiază 6 fracțiuni proteice, pe cînd în agaroză, datorită subfracționării componentelor β și γ, apar 10 fracțiuni. O astfel de separare înaintată nu se poate realiza decît pe gel de amidon, de aceea merită o atenție specială, mai ales în vederea extinderii întrebuințării agarozei și la studiul unor componente serice ca transferina, haptoglobinele etc., ce se studiază în prezent prin tehnica electroforezei pe gel de amidon.

Analiza electroforetică a proteinelor din organele de iepure și șobolan nu a relevat deosebiri importante între agaroză și agar. Cu toate că proteinele s-au fracționat în același număr de componente în ambele geluri, totuși în gelurile de agaroză fracțiunile erau mult mai bine delimitate, identificarea lor făcîndu-se cu mai mare ușurință decît pe gelul de agar.

Gelul de agaroză s-a arătat deosebit de eficient la separarea proteinelor tisulare de origine vegetală, folosind tamponul borat-fosfat.

Astfel, proteinele din cotiliedoanele de bob se separă pe agaroză în 6 fracțiuni, în timp ce în agar nu se pot observa mai mult de 4 fracțiuni (fig. 2). Se observă că, spre deosebire de agaroză, pe agar nu se separă nici chiar cele două componente fundamentale, legumina (fracțiunea 2) și vicilina (fracțiunea 3).

Și pentru proteinele foliare agaroza este un mediu de suport mai bun (fig. 2). Se observă că pe agaroză fracționarea proteinelor este mai avansată decît pe agar. Fracțiunile 5 și 6 sînt net separate pe agaroză, în timp ce în agar aceste fracțiuni se găsesc neseparate în zona startului.

Imunodifuzia a condus, în general, la rezultate similare cu cele obținute de S. Hjertén [4]. Astfel, în dubla difuzie pe agaroză s-a con-

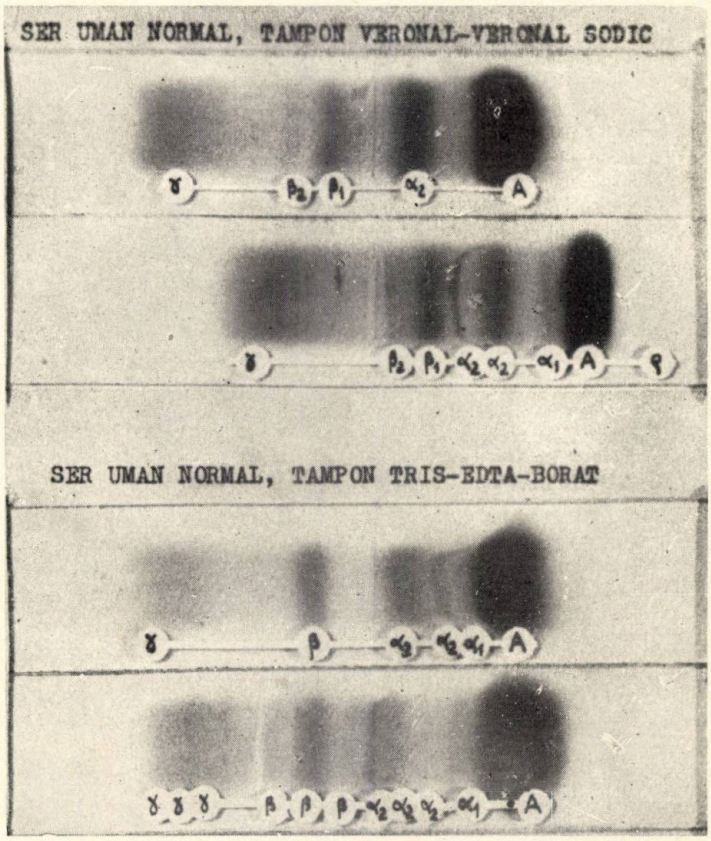


Fig. 1. — Electroforeza serului uman normal în tampon veronal-veronal sodic (sus = agar; jos = agaroză) și tampon Tris-EDTA-borat (sus = agar; jos = agaroză).

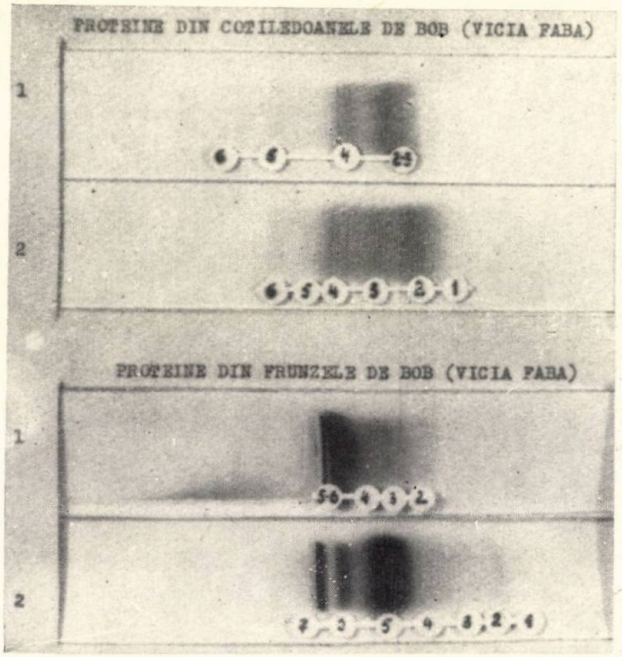


Fig. 2. — Electroforeza proteinelor din cotiledoanele și frunzele de bob (*Vicia faba*).

1 = agar; 2 = agaroză.

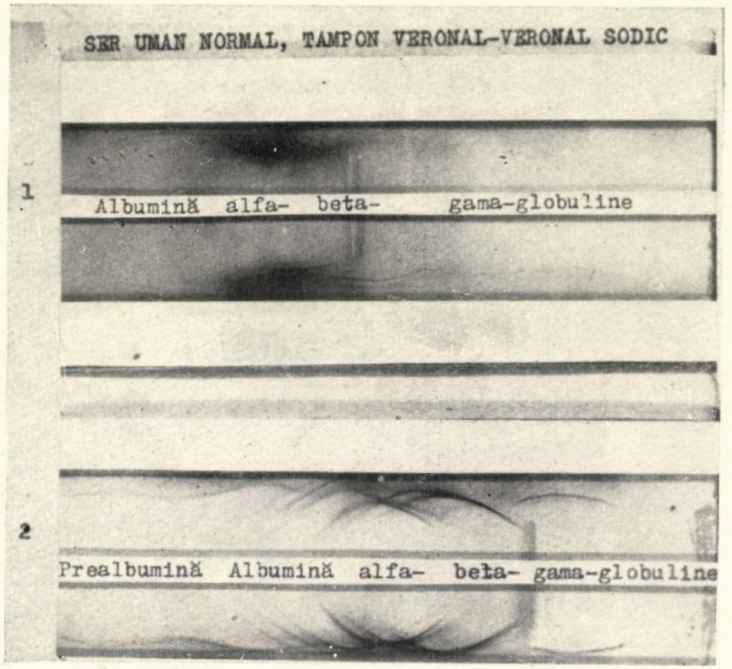


Fig. 3. — Imunoelectroforeza serului uman normal în tampon veronal-veronal sodic.

1 = agar; 2 = agaroză.

statat dispariția haloului, ceea ce permite evidențierea unor linii de precipitare mascate în gelul de agar. Din analiza imunoelectroforetică a proteinelor din serul uman normal au reieșit aceleași calități ale agarozei : linii de precipitare foarte fine, mult mai net conturate ca în gelul de agar. De asemenea, datorită faptului că în agaroză proteinele serice sînt separate în mai multe fracțiuni decît în agar, liniile de precipitare sînt mai distanțate, făcînd citirea și interpretarea imunoelectroforegramelor mai ușoară (fig. 3).

Rezultatele obținute arată că agaroza formează un gel care constituie un mediu de suport pentru electroforeză mult superior agarului, atît din cauza absenței electroendosmozei și adsorbției, cît și din punctul de vedere al capacității de rezoluție electroforetică. De aceea, se impune stabilirea exactă a capacității de separare a acestui gel în comparație cu amidonul, gelul cu cea mai mare putere de rezoluție electroforetică cunoscută pînă în prezent. Asupra acestei probleme vom reveni într-o lucrare viitoare.

Prezentată la redacție la 10 aprilie 1962

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R., București

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ И ИММУНОДИФФУЗИЯ БЕЛКОВ В ГЕЛЕ АГАРОЗЫ

РЕЗЮМЕ

Гель агарозы является прекрасной средой для электрофореза белков, так как он обладает гораздо большей разрешающей способностью, чем агар. Так, в агарозе фракционирование сывороточных белков имеет место во много большей степени, чем в агаре. Белки различных органов зайцев и крыс выявляют более четкое ограничение фракций в агарозе, чем в агаре. Наконец, белки долек и листьев Vicia faba больше дифференцируются в геле агарозы, чем в агаре. Иммуноэлектрофорез и двойная диффузия в агарозе дают кривые осаждения, форма и расположение которых гораздо более четки в агарозе, чем в агаре; это позволяет легче определять и интерпретировать иммунодиффузию.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Электрофорез нормальной сыворотки человека при буферном растворе веронал-натриевая соль веронала (наверху агар; внизу агароза) и при буфере Трис-ЭДТА-борат (наверху агар; внизу агароза).

Рис. 2. — Электрофорез белков долек и листьев Vicia faba; *1* — агар; *2* — агароза.

Рис. 3. — Иммуноэлектрофорез нормальной сыворотки человека при буферном растворе веронал-натриевая соль веронала; *1* — агар; *2* — агароза.

L'ÉLECTROPHORÈSE ET L'IMMUNO-DIFFUSION DES PROTÉINES DANS LE GEL D'AGAROSE

RÉSUMÉ

Le gel d'agarose constitue un excellent milieu pour l'électrophorèse des protéines parce qu'il possède une capacité de résolution de beaucoup supérieure à l'agar-agar. Le fractionnement des protéines du sérum est par exemple beaucoup plus avancé dans l'agarose que dans l'agar-agar. Des protéines provenant de divers organes du lapin et du rat présentent dans l'agarose une plus nette délimitation de leurs fractions que dans l'agar-agar. Enfin, les protéines des cotylédons et des feuilles de fève (*Vicia faba*) présentent un plus haut degré d'hétérogénéité dans le gel d'agarose que dans celui d'agar-agar. L'immunoélectrophorèse et la double diffusion dans l'agarose produisent des lignes de précipitation dont la forme et la position est beaucoup plus claire dans l'agarose que dans l'agar-agar, ce qui permet une lecture et une interprétation plus aisée de l'imunodiffusion.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Electrophorèse du sérum humain normal avec tampon véronal-véronal sodique (en haut = agar agar ; en bas = agarose) et avec tampon de tris- EDTA-borate (en haut — agar-agar ; en bas = agarose).

Fig. 2. — Electrophorèse des protéines des cotylédons et des feuilles de fève (*Vicia faba*).

1 = agar-agar ; 2 = agarose.

Fig. 3. — Immuno-électrophorèse du sérum humain normal avec tampon véronal-véronal sodique.

1 = agar-agar ; 2 = agarose.

BIBLIOGRAFIE

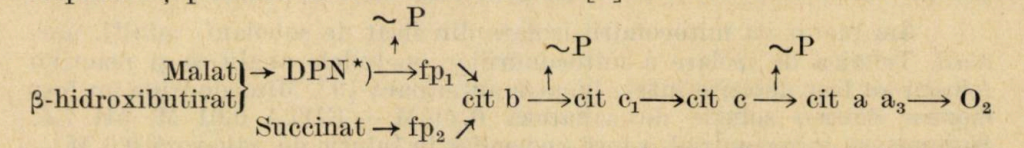
1. H. G. KUNKEL, R. TRAUTMAN, *Zone electrophoresis in various types of supporting media*, în M. BIER, *Electrophoresis, Theory, methods and applications*, Acad. Press Inc., New York, 1959, 226.
2. C. ARAKI, *Structure of the agarose constituent of agar-agar*, Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 543 (1956).
3. S. HJERTÉN, *Agarose as an anticonvectional agent in electrophoresis*, Biochim. Biophys. Acta, **53**, *3*, 518 (1961).
4. S. BRISHAMMAR, S. HJERTÉN, B. HOFSTEN, *Immunological precipitates in agarose gels*, Biochim. Biophys. Acta, **53**, *3*, 518 (1961).
5. O. SMITHIES, *Zone electrophoresis in strach gels and its application to studies of serum proteins*, Adv. Prot. Chem., **14**, 65 (1959).
6. P. GRABAR, P. BURTIN — *Analyse imuno-électrophorétique, Ses applications aux liquides biologiques*, Masson, Paris, 1960.
7. O. OUCHTERLONY, *Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reaction in correlated systems of diffusion*, Acta Path. Scand., **32**, 231 (1953).
8. G. BISERTE, P. PAYSANT, R. HAVEZ, A. RACADOT, *Intérêt du tampon „Tris-EDTA-borate" (TEB) pour l'électrophorèse sur papier des serums normaux et pathologiques*, Ann. Biol. Clin., **28**, *10—12*, 603 (1960).
9. V. GHEȚIE, *Mărirea capacității de rezoluție electroforetică a tamponului borat prin adăugarea ionului fosfat*, Studii și cercetări de biochimie, **IV**, *3*, 397 (1961).
10. R. CONSDEN, W. M. STANIER, *Ionophoresis of sugars on paper and some applications to the analysis of protein polysaccharide complexes*, Nature, **169**, *4306*, 783 (1952).

INFLUENȚA DECUPLANȚILOR, A INHIBITORILOR TRANSPORTULUI DE ELECTRONI ȘI A CONCENTRAȚIEI SUBSTRATULUI ASUPRA CÎTULUI DE FOSFORILARE CU SUCCINAT

DE

C. GURBAN și ELENA CRISTEA

Problema în sine a valorii raportului P/O în mitocondriile din diferite țesuturi animale părea rezolvată după apariția lucrărilor lui Copenhaver și Lardy [1] și Chance și colaboratori [2]. Schema lanțului respirator și punctele de fosforilare stabilite [3] sînt cele indicate în schemă.



Cercetările foarte numeroase care s-au făcut ulterior în domeniul fosforilării oxidative cu mitocondrii întregi sau cu fragmente mitocondriale au avut drept scop mai mult clarificarea mecanismelor de generare a legăturilor macroergice, descoperirea de noi componenți ai lanțului respirator, și mai puțin pe acela de a determina valoarea maximă posibilă a raportului P/O. Totuși, problema valorii raportului P/O a rămas în atenția cercetătorilor, pentru că uneori s-au obținut cîturi P/O mai mari decît cele admise pentru diferitele substrate.

Cu succinat, R. E. Beyer și R. D. Kennison [4] au obținut cîturi mai mari de 2 cu mitocondrii izolate din ficat de pui deficient în vitamină K. Tot cu succinat, în laboratorul lui Slater s-au obținut, s-ar părea în mod accidental, cîturi P/O peste 2, lucrîndu-se chiar cu mitocondrii izolate din ficat de șobolan normal. Cercetînd mai îndeaproape acest feno-

*) Prescurtările utilizate sînt următoarele: DPN = difosfopiridinnucleotid oxidat; DPNH = difosfopiridinnucleotid redus; ATP = acid adenozintrifosforic; fp = flavoproteine; cit b, c_1, c, a, a_3 = seria citocromilor; ~ P = fosfat macroergic; EDTA = acid etilendiaminotetraacetic; TRIS = tris- (hidroximetil)-aminometan.

men, P. Greengard şi colaboratori [5] ajung la concluzia că în cazurile în care cîturile P/O cu succinat au valori mai mari de 2, aceasta se datoreşte oxidării malatului rezultat din succinat (v. schema).

Cîturi P/O mai mari decît cele prevăzute de schemă au fost obţinute nu numai cu succinat, ci şi cu alte substrate şi cu mitocondrii izolate din diferite ţesuturi [6], [7]. Cei care citează astfel de valori consideră că aceasta se datoreşte funcţionării lanţului respirator cu mai multe puncte de conservare şi transfer a energiei decît cele date în schemă. Astfel, R. D. Dallam şi R. B. Howard au obţinut cu β-hidroxibutirat cîturi P/O între 3 şi 4 [6]. J. Ramirez şi A. Mujica obţin cu ascorbat cîturi mai mari de 1 [7]. De asemenea, B. Chance şi G. Hollunger [8], pe baza cercetărilor făcute cu inhibitori ai reacţiilor de conservare a energiei, ajung la concluzia că este posibil să existe o etapă suplimentară de conservare a energiei.

Într-o lucrare anterioară [9] noi am arătat că, în condiţiile noastre de lucru, mitocondriile izolate din ficatul de şobolan normal dau în mod frecvent cîturi P/O mai mari de 2. Ţinînd seama de rezultatele obţinute de autorii citaţi, ne-am propus să cercetăm în ce măsură cîturile mari obţinute de noi cu succinat sînt datorite existenţei unei etape suplimentare de fosforilare sau (şi) suprapunerii oxidării succinatului, cu oxidarea malatului rezultat din succinat. Rezultatele obţinute sînt prezentate în lucrarea de faţă şi în următoarea din această revistă.

MATERIAL ŞI METODE

Am lucrat cu mitocondrii izolate din ficat de şobolani adulţi, normali. Tehnica de izolare a mitocondriilor, metodele analitice şi reactivii folosiţi au fost descrise într-o lucrare anterioară [9]. Mitocondriile au fost depuse dintr-o soluţie de zaharoză 0,44 M + EDTA 0,01 M, pH 7,4. Sedimentul mitocondrial a fost suspendat în soluţie de zaharoză 0,3 M + TRIS 0,1 M, pH 7,4.

Consumul de oxigen a fost determinat prin tehnica manometrică Warburg. Mediul de reacţie (3 ml) a avut următoarea compoziţie (se dau concentraţiile finale în cupă): tampon fosfat de potasiu 10 mM, pH 7,4, citocrom c 0,02 mM, $MgSO_4$ 6,7 mM, ATP 0,5 mM, succinat 10 mM sau 30 mM, EDTA 1 mM, zaharoză 0,1 M, glucoză 30 mM şi 0,3 ml hexokinază. Din suspensia mitocondrială s-au introdus 0,5 ml, ceea ce corespunde la circa 10—12 mg proteină mitocondrială. Reacţia a fost declanşată prin adăugarea hexokinazei şi glucozei în compartimentul principal, după circa 7 min de termoechilibrare la 25°C. Timpul de incubaţie a fost de 20 min.

Fosfatul anorganic a fost dozat prin metoda Fiske-Subbarow [10]. Proteinele din suspensia mitocondrială au fost dozate prin reacţia biuretului. Solubilizarea proteinelor mitocondriale s-a făcut cu dezoxicolat [11]. Peste 0,1—0,8 ml suspensie mitocondrială se adaugă 0,2 ml soluţie de dezoxicolat 5%. Pentru dezvoltarea culorii se adaugă apoi 5 ml suspensie alcalină de hidroxid de cupru proaspăt precipitat, obţinut prin adăugarea de 2,5 ml $CuSO_4$ 20% peste 100 ml NaOH 3% [12]. Se lasă o

jumătate de oră, agitîndu-se din timp în timp, se centrifughează şi se citesc extincţiile la 555 mμ. Pentru etalonare s-a folosit serum-albumină bovină, cristalizată.

REZULTATE

Influenţa decuplanţilor şi a inhibitorilor transportului de electroni. Mitocondriile din ficatul de şobolan, incubate cu succinat 10 mM, timp de 20 min, dau cîturi P/O cu o valoare medie de 2,20, aşa cum rezultă din datele publicate anterior [9] şi din prima parte a tabelelor 1 şi 2 din prezenta lucrare. Ne-am pus problema dacă această creştere a valorilor cîtului P/O este de fapt consecinţa captării fosfatului anorganic în alte reacţii decît cele implicate în fosforilarea legată de lanţul respirator. Deoarece hexokinaza folosită nu este un preparat cristalizat şi ar cuprinde eventual enzime ale sistemului glicolitic, posibilitatea captării fosfatului anorganic în reacţii glicolitice trebuia exclusă. Pentru aceasta, în unele experienţe am adăugat mediului de reacţie 2,4-dinitrofenol. Acesta aboleşte fosforilarea legată de lanţul respirator, fără să afecteze fosforilarea glicolitică sau de substrat. În experienţele în care s-a folosit 2,4-dinitrofenol (0,05 mM) nu s-a constatat captare de fosfat anorganic, ci, dimpotrivă, o uşoară creştere a concentraţiei lui. Acest fenomen l-am pus pe seama activării ATP-azelor mitocondriale, care au eliberat fosfatul terminal din ATP-ul adăugat în mediul de reacţie în cantităţi catalitice.

De asemenea, cianura de potasiu, inhibitor al transportului de electroni în sistemul citocromilor, blochează total respiraţia şi captarea de fosfat anorganic. Anaerobioza obţinută prin vidare şi adaos de ditionit de sodiu (0,4 mM) blochează complet reacţiile de fosforilare.

Rezultatele obţinute în prezenţa 2,4-dinitrofenolului, a cianurii şi în anaerobioză arată că valorile crescute ale cîtului P/O sînt determinate de reacţii de fosforilare legate de lanţul respirator, şi nu de intervenţia altor procese.

Influenţa concentraţiei substratului. Valorile mari, peste 2, ale cîtului P/O obţinute cu succinat au fost explicate admiţînd că oxidarea succinatului ar avea loc nu numai pînă la fumarat, ci mai departe, cu formare intermediară de malat. Aceasta ar avea drept consecinţă obţinerea de valori mai mari de 2 pentru cîturile P/O, căci o parte din oxigenul consumat ar fi utilizat pentru oxidarea malatului. Acest punct de vedere este susţinut de O. Lindberg şi L. Ernster [13], de R. E. Beyer şi R. D. Kennison [4] şi de P. Greengard şi colaboratori [5].

Considerînd că la concentraţii mai mari de succinat probabilitatea oxidării fumaratului este redusă, am făcut determinări ale raportului P/O utilizînd o concentraţie a succinatului de 3 ori mai mare (30 mM). Rezultatele obţinute sînt menţionate în partea a doua a tabelei 1. Aşa cum reiese din tabelă, cîturile P/O scad la valori sub 2, cu o valoare medie de 1,73. Această valoare concordă cu cele mai multe din datele din literatură şi, de asemenea, cu cele citate de P. Greengard şi colaboratori [5], pentru aceeaşi concentraţie a succinatului. Această scădere are loc pe

seama creşterii consumului de oxigen cu circa 40%. Consumul de fosfat anorganic creşte însă numai cu circa 12%, ca şi cînd creşterea concentraţiei

Tabela 1

Influenţa concentraţiei substratului asupra valorii raportului P/O

Mediul de incubaţie cuprinde : fosfat de potasiu 30 μ moli, pH 7,4 ; citocrom c 0,06 μ moli, $MgSO_4$ 20,1 μmoli, KF 4,2 μmoli, ATP 1,5 μmoli, EDTA 3 μ moli, zaharoză 300 μ moli, succinat 30 sau 90 μ moli şi suspensie de mitocondrii în compartimentul principal 0,5 ml ; glucoză 90 μmoli şi hexokinază 0,3 ml în diverticul. Volum final 3 ml. În fîntîna centrală se adaugă 0,2 ml KOH 10%. Timp de incubaţie 20 min. ; temperatura 25° C.

Numărul experienţei	Succinat 10 mM			Succinat 30 mM		
	ΔP μ moli	ΔO μ atomi	P/O	ΔP μ moli	ΔO μ atomi	P/O
1	10,16	4,75	2,14	10,68	6,21	1,72
2	10,88	4,73	2,30	9,43	4,60	2,05
3	12,38	5,53	2,24	10,57	5,94	1,78
4	11,91	5,70	2,09	10,24	5,92	1,73
5	10,21	4,40	2,32	13,66	7,63	1,79
6	8,93	4,83	1,85	13,97	9,25	1,51
7	11,37	4,89	2,32	14,01	7,89	1,77
8	12,55	5,54	2,26	17,15	9,07	1,89
9	13,92	5,17	2,69	14,51	9,54	1,52
Medii	11,36	5,06	2,24	12,69	7,33	1,73

substratului ar determina o stimulare mai marcată a respiraţiei decît a fosforilării. Cu toate că influenţa concentraţiei succinatului ar putea fi mai complexă, scăderea valorii cîturilor P/O la concentraţii crescute pledează în favoarea ipotezei creşterii cîtului P/O prin oxidarea simultană atît a succinatului, cît şi a malatului rezultat.

Influenţa amitalului. Un alt mod de a verifica dacă suprapunerea oxidării succinatului peste aceea a malatului este implicată în creşterea valorii cîtului P/O, a fost utilizarea amitalului (acid 5-etil-5-izoamil-barbituric). Acesta, în concentraţii de 1 mM, blochează transportul de electroni între piridinnucleotizi şi flavoproteine, fără să influenţeze transportul electronilor de la succinat la flavoproteine [14], [15]. De asemenea, amitalul nu afectează fosforilarea asociată cu oxidarea succinatului [16].

Într-o serie de experienţe am incubat mitocondriile cu succinat 10 mM în prezenţa amitalului (1 mM). Rezultatele obţinute sînt date în partea a doua a tabelei 2. Valoarea cîtului P/O scade de la 2,18 în experienţele fără amital, la 1,72 în prezenţa amitalului. Micşorarea valorilor cîtului P/O are loc pe seama scăderii consumului de fosfat cu circa 25% faţă de experienţele de control. Consumul de oxigen a rămas aproape constant.

Deci, în condiţiile în care oxidarea DPNH-ului este blocată, succinatul este oxidat cu un cît P/O cu valori mai mici sau cel mult egale cu 2.

Tabela 2

Influența amitalului asupra valorii raportului P/O

Mediul de incubație cuprinde succinat 30 μmoli și în unele experiențe amital 3 μmoli; ceilalți reactivi ca în tabela 1. Timp de incubație 20 min, temperatura 25° C

Numărul experienței	Succinat 10 mM			Succinat 10 mM + amital 1 mM		
	ΔP μ moli	ΔO μ atomi	P/O	ΔP μ moli	ΔO μ atomi	P/O
1	14,90	6,41	2,32	11,96	6,87	1,74
2	13,92	6,16	2,25	12,65	6,50	1,94
3	12,54	5,75	2,18	9,90	6,19	1,59
4	17,38	8,25	2,10	13,49	7,40	1,80
5	11,11	5,05	2,20	8,06	4,27	1,89
6	11,88	5,53	2,14	7,25	4,62	1,56
7	10,32	4,54	2,27	6,53	3,95	1,65
8	9,42	4,82	1,95	5,48	3,83	1,43
Medii	12,68	5,81	2,18	9,41	5,45	1,72

DISCUȚIA REZULTATELOR

Rezultatele prezentate într-o lucrare anterioară [9] și cele prezentate aici arată clar că mitocondriile din ficatul de șobolan dau cîturi P/O cu valori mai mari de 2 cînd concentrația substratului este de circa 10 mM. Aceasta este concentrația folosită de J. H. Copenhaver și H. A. Lardy [1] în experiențele clasice care au dus la stabilirea randamentului energetic al fosforilării legate de lanțul respirator, pentru diferite substrate. Valorile experimentale pentru succinat sînt cel mai adesea mai mici de 2 [1], [2]. Greengard și colaboratori [5] discută îndeaproape problema cîtului P/O cu succinat și menționează valori peste 2. Totuși, din datele prezentate de acești autori rezultă că frecvența valorilor ridicate ale cîtului P/O nu este foarte mare. În experiențele noastre cîturi cu valori mai mari de 2 se obțin aproape constant, părînd deci că aceasta ar fi situația normală.

Experiențele noastre în care concentrația succinatului a fost de 30 mM, ca și acelea în care s-a inclus în mediul de incubație amital, par să confirme punctul de vedere susținut de toți aceia care au obținut cu succinat cîturi P/O mai mari de 2, adică oxidarea succinatului dincolo de fumarat. Deoarece această ipoteză implică intervenția DPN-ului în lanțul de reacții, în unele experiențe am inclus în mediul de incubare DPN într-o concentrație de 0,75 mM. Aceasta nu a avut însă nici o influență asupra valorii cîtului P/O.

Datorită faptului că în experiențele noastre se obțin cîturi P/O mai mari de 2, foarte frecvent și cu valori care ating uneori cifre peste 2,3, ne-am pus, încă de la început, problema dacă acest fapt nu se datorește și contribuției unei etape suplimentare de fosforilare, a cărei existență este susținută de cercetătorii care au obținut cîturi P/O mai mari decît cele admise clasic cu alte substrate. Cu toate că datele obținute cu amital și concentrații crescute de substrat constituie un argument destul

de puternic în favoarea interferenţei oxidării malatului şi succinatului, nu este exclus ca în condiţiile determinărilor efectuate de noi să avem de-a face şi cu intervenţia acestei etape probabile. Punem această problemă, fiindcă ni se pare curios ca în cazul succinatului această etapă să nu fie operativă.

Că interferenţa oxidării succinatului cu oxidarea fosforilantă a malatului contribuie la creşterea valorii cîtului P/O pare a fi un fapt demonstrat, mai ales atunci cînd se folosesc perioade de incubare lungi, 20—30 min [5]. Totuşi, unele date obţinute de noi [17] par a sprijini punctul de vedere că valoarea mare a cîtului P/O nu poate fi explicată prin interferenţa oxidării succinatului cu a DPNH-ului.

CONCLUZII

Mitocondriile din ficatul de şobolan dau foarte frecvent cu succinat 10 mM, după 20 min de incubare la 25°C, cîturi P/O cu valori mai mari de 2 (în medie 2,20). Valoarea mare a cîtului P/O este determinată de esterificarea fosfatului anorganic în procese oxidative şi nu prin alte mecanisme. La mărirea concentraţiei substratului de 3 ori sau prin adăugarea de amital, cîturile P/O scad la valori de 1,7. Sensibilitatea faţă de concentraţia substratului şi faţă de prezenţa amitalului pare să indice că fenomenul este determinat de contribuţia oxidării malatului, rezultat din succinat, aşa cum consideră şi alţi autori.

Prezentată la redacţie la
31 martie 1962

Laboratorul de biochimie,
Facultatea de medicină, Bucureşti

ВЛИЯНИЕ ДЕКУПЛИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ, ИНГИБИТОРОВ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ И КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА НАРЕЗУЛЬТАТ ФОСФОРЕЛИРОВАНИЯ В ПРИСУТСТВИИ СУКЦИНАТА

РЕЗЮМЕ

Авторы постоянно получали при работах с митохондриями, выделенными из печени крысы, в присутствии сукцината (10 мМ), после инкубации в течение 20 мин., отношения P/O намного больше двух.

Возрастание значения отношения P/O определяется связыванием неорганического фосфата в результате окислительных процессов, так как декуплирующие вещества и ингибиторы дыхательного цикла полностью задерживают это связывание. При концентрациях субстрата, равных 30 мМ, или же в присутствии амитала (1 мМ) значение отношения P/O понижается примерно до 1,7. Это подтверждает гипотезу, выдвинутую также и другими авторами, согласно которой значения отношения P/O, превышающие 2, в присутствии сукцината, определяются дальнейшим окислением фумарата.

INFLUENCE DES DÉCOUPLANTS, DES INHIBITEURS DU TRANSPORT D'ÉLECTRONS ET DE LA CONCENTRATION DU SUBSTRATUM SUR LE QUOTIENT DE LA PHOSPHORYLATION AU SUCCINATE

RÉSUMÉ

Les auteurs ont constamment obtenu avec des mitochondries isolées du foie de rat, en présence du succinate 10 mM, après 20 minutes d'incubation, des rapports P/O à des valeurs sensiblement supérieures à 2.

L'accroissement de la valeur du quotient P/O est déterminé par la captation du phosphate inorganique par des processus oxydatifs, car les découplants et les inhibiteurs de la chaîne respiratoire abolissent complètement cette captation. À des concentrations du substratum de 30 mM ou en présence de l'amital (1 mM) la valeur du rapport P/O diminue jusqu'à 1,7 environ. Ceci vient appuyer l'hypothèse, soutenue par d'autres auteurs aussi, d'après laquelle les valeurs plus grandes que 2 du quotient P/O au succinate seraient déterminées par l'oxydation ultérieure du fumarate.

BIBLIOGRAFIE

1. J. H. Copenhaver, H. A. Lardy, J. biol. Chem., **195**, 225 (1952).
2. B. Chance, C. R. Williams, Adv. Enzymol. **17**, 65 (1956).
3. B. Chance, G. Hollunger, J. biol. Chem., **236**, 1562 (1961).
4. R. E. Beyer, R. D. Kennison, Arch. Biochem. Biophys., **84**, 63 (1959).
5. P. Greengard, K. Minnaert, E. C. Slater, J. Betel, Biochem. J., **73**, 637 (1959).
6. R. D. Dallam, R. B. Howard, Biochim. Biophys. Acta, **37**, 188 (1960).
7. J. Ramirez, A. Mujica, Feder. Proc., **20**, 49 (1961).
8. B. Chance, G. Hollunger, Feder. Proc., **20**, 50 (1961).
9. C. Gurban, E. Cristea, Studii şi cercetări de biochimie, **4**, *4*, 551 (1961).
10. C. H. Fiske, Y. Subbarow, J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).
11. E. E. Jacobs, M. Jacob, J. Biol. Chem., **223**, 147 (1956).
12. W. N. Aldridge, Biochem. J., **67**, 423 (1957).
13. O. Lindberg, L. Ernster, în *Protoplasmatologia*, **III/A$_4$**, Viena, Springer Verlag, 1954, 43.
14. L. Ernster, în *The structure and function of subcellular components*. Cambridge, 1959, 54.
15. D. E. Green, *Structure and function of subcellular particles*. Al V-lea Congres internațional de biochimie, Moscova, 1961.
16. W. N. Aldridge, V. H. Parker, Biochem. J., **76**, 47 (1960).
17. C. Gurban, E. Cristea, Studii şi cercetări de biochimie, **5**, *3*, 423 (1962).

INFLUENȚA TIMPULUI DE INCUBARE ASUPRA VALORII CÎTULUI DE FOSFORILARE CU SUCCINAT

DE

C. GURBAN și ELENA CRISTEA

Am arătat într-o lucrare publicată anterior [1] și, de asemenea, în nota precedentă [2], că dacă mitocondriile din ficat de șobolan se incubează cu succinat 10 mM timp de 20 min (în condiții fosforilante), se obțin cîturi P/O care depășesc foarte frecvent valoarea 2.

În nota [2] am mai arătat că valoarea cîtului este sensibilă la variația concentrației substratului, în sensul că dacă concentrația succinatului este mărită de trei ori (30 mM), valoarea cîtului scade la circa 1,7 (la 20 min de incubare).

De asemenea, în prezența amitalului, cîtul P/O scade pînă la valori de circa 1,7.

Aceste date sînt în concordanță cu acelea ale lui P. Greengard și colaboratori [3], care au menționat încă mai înainte că cu succinat se obțin uneori cîturi P/O cu valori peste 2, ce scad în prezența amitalului sau la creșterea concentrației succinatului. Acești autori, ca și alții care au mai obținut cu succinat cîturi mai mari de 2, consideră că este vorba de oxidarea succinatului nu numai pînă la fumarat, ci mai departe, conform schemei *):

$$\text{succinat} + \text{fp} \rightarrow \text{fumarat} + \text{fpH}_2 \qquad (1)$$

$$\text{fpH}_2 + 1/2\ \text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{fp} \qquad (2)$$

$$\downarrow$$

$$2 \sim \text{P}$$

cu un cît P/O cu valoarea 2

$$\text{fumarat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{malat} \qquad (3)$$

$$\text{malat} + \text{DPN}^+ \rightarrow \text{oxalacetat} + \text{DPNH} + \text{H}^+ \qquad (4)$$

$$\text{DPNH} + \text{H}^+ + 1/2\ \text{O}_2 \longrightarrow \text{DPN}^+ + \text{H}_2\text{O} \qquad (5)$$

$$\downarrow$$

$$3 \sim \text{P}$$

cu un cît P/O cu valoarea 3.

---

*) Prescurtările folosite sînt aceleași ca și în nota precedentă.

Deci, oxidarea succinatului la un stadiu mai avansat (oxalacetat) presupune desfăşurarea în paralel şi a reacţiei (5), cu formarea a trei legături macroergice. Valoarea medie a cîtului P/O va fi 2,5 dacă oxidarea succinatului, o dată începută, merge pînă la oxalacetat (reacţiile (2) şi (5) desfăşurîndu-se cu viteze egale). Dacă numai 50% din fumaratul format este oxidat fosforilant la oxalacetat, cîtul P/O va trebui să aibă cel mult valoarea 2,2 (care reprezintă de fapt media valorilor obţinute de noi sau citată de alţi autori). Punctul acesta de vedere este de altfel sprijinit şi de faptul că în cazul incubării mitocondriilor cu succinat 10 mM, sau în concentraţii mai mici, unii autori au putut pune în evidenţă formarea în mediul de reacţie a oxalacetatului [4], [3], [5].

Pe de altă parte, H. A. Krebs şi colaboratori [11] şi R. Whittam şi colaboratori [12] folosind reacţia de schimb ATP-$^{32}P_i$ (încorporarea $^{32}P_i$ în ATP) determină valoarea cîtului P/O considerînd că raportul dintre viteza reacţiei de schimb ATP-$^{32}P_i$ şi viteza consumului de oxigen este expresia fidelă a cîtului P/O. H. A. Krebs şi colaboratori [11] lucrînd cu preparate din ficat de şobolan găseşte pentru succinat cîturi de circa 2 sau sub 2. Cu preparate din muşchiul pieptului de porumbel sau din inimă de oaie găseşte valori peste 2, care scad în timp. R. Whittam şi colaboratori [12] refac experienţele lui H. A. Krebs şi ajung la concluzia că scăderea în timp a cîtului P/O nu este datorită scăderii capacităţii de fosforilare. Ei consideră că scăderea este consecinţa intervenţiei încorporării fosfatului radioactiv şi în poziţia β din ATP, care se face cu viteză scăzută.

H. Löw şi colaboratori [13] susţin însă că reacţia de schimb ATP-$^{32}P_i$ nu este repartizată în mod identic asupra tuturor etapelor din lanţul respirator implicate în fosforilare, ci priveşte în special regiunea flavoproteinelor. B. Chance şi B. Hagihara [14] consideră chiar că reacţia de schimb ATP-$^{32}P_i$ nu ar fi legată direct de procesele de fosforilare din lanţul respirator.

Pe de altă parte, aşa cum s-a mai precizat [2], în anii din urmă au apărut lucrări care tind să arate că lanţul respirator poate funcţiona cu o etapă fosforilantă suplimentară faţă de schema clasică. Unii autori [6], [7] precizează că această etapă este situată între citocromul a şi oxigen.

Deoarece în cazul nostru cîturile P/O cu succinat sînt sensibile la variaţia concentraţiei substratului şi la amital, am considerat că dacă este vorba de suprapunerea reacţiilor (2) şi (5) (v. schema), atunci cîturile P/O vor trebui să crească în timp, datorită creşterii proporţiei de fumarat, respectiv malat.

Experienţe preliminare ne-au arătat că, dimpotrivă, cîturile P/O scad foarte mult cu timpul.

În lucrarea de faţă prezentăm rezultatele unor determinări după diferite tipuri de incubare, analizîndu-le din punctul de vedere al suprapunerii reacţiilor (2) şi (5) din schemă şi din punctul de vedere al posibilităţilor contribuţiei unei etape suplimentare de fosforilare, existentă probabil în porţiunea terminală a lanţului respirator.

MATERIALE ŞI METODĂ

S-a lucrat cu mitocondrii obţinute din ficatul de şobolan normal, folosind în principiu tehnica de izolare descrisă anterior [1]. Uneori s-a folosit ca mediu de omogenizare, în loc de zaharoză 0,44 M+EDTA 0,01 M pH 7,4, un mediu ce conţine zaharoză 0,44 M+EDTA 0,001 M pH 7,4. Pentru omogenizarea ţesutului s-a folosit în experienţele menţionate aici un omogenizator cu piston din masă plastică (PVC sau plexi), cu distanţa între piston şi peretele interior al omogenizatorului de 0,1—0,2 mm. Folosirea unui astfel de omogenizator ne-a permis să obţinem mitocondrii al căror control respirator, cu succinat, să ajungă la valoarea 2.

Determinarea consumului de oxigen, dozarea fosfatului anorganic şi a proteinelor mitocondriale s-a făcut după metodele descrise anterior [1], [2]. Mediul de reacţie a fost cel descris în altă lucrare [1], cuprinzînd în plus DPN 0,75 mM. Volumul final a fost de 3 sau 2 ml.

REZULTATE

Variaţia valorii cîtului P/O cu timpul de incubare. Considerînd că oxidarea succinatului a mers pînă dincolo de malat şi că reacţiile (2) şi (5) ar contribui împreună la esterificarea fosfatului anorganic, este de observat că valoarea cîtului P/O nu ar putea avea valori mai mari de 2,5. Pe măsură ce se acumulează în sistem fumarat şi malat, ar trebui să se observe o creştere a cîturilor, deoarece devine posibilă creşterea vitezei reacţiei (5) faţă de aceea a reacţiei (2).

În tabela 1 sînt prezentate valorile cîtului P/O determinate după 6—8, 13, 18, 23 şi 27 min de incubare cu succinat 10 mM.

Tabela 1

Influenţa timpului de incubare asupra valorii cîtului P/O

Mediul de incubaţie cuprinde: tampon fosfat de potasiu 10 mM, pH 7,4; citocrom c 0,02 mM; $MgSO_4$ 6,7 mM; DPN 0,75 mM; ATP 0,5 mM; succinat 10 mM; EDTA 1 mM; zaharoză 0,1 M şi 0,5 ml suspensie mitocondrială în compartimentul principal: glucoză 30 mM şi 0,3 ml hexokinază în diverticul. Volum final 3 sau 2 ml. În fîntîna centrală se adaugă 0.2 ml KOH 10%. Temperatura 25°C

Nr. experienţei	Timpul de incubare min					
	6—8	13	18	23	27	30
1	2,98	2,39	2,16	2,00	—	1,79
2	3,31	2,51	2,18	2,15	1,98	1,81
3	2,71	2,14	—	2,00	—	1,79
4	2,59	2,87	2,18	2,17	2,03	—
5	2,47	2,25	2,25	1,99	1,90	—
6	2,35	2,29	2,16	2,07	1,60	—
7	2,95	2,53	2,50	2,18	—	—
8	3,26	2,23	2,45	2,42	—	—
9	3,28	2,31	2,28	2,12	—	—
10	3,25	2,45	2,26	2,19	—	—

Din datele înscrise în tabelă ies în evidenţă două aspecte : a) valori ale cîtului P/O peste 2,5 în primele minute, şi b) scăderea acestora în timp. Într-adevăr, în primele 6—8 minute cîtul are valori de aproximativ 3 (cifrele prezentate în prima coloană a tabelei 1 sînt valori determinate la 6, 7, sau 8 min); la 13 min valoarea medie este 2,4, la 18 min 2,3, la 23 min 2,13, la 27 min 1,9, la 30 min 1,8.

Faptul că valorile cîturilor P/O scad în timp este greu de interpretat dacă admitem că creşterea este determinată numai de suprapunerea reacţiei (2) cu reacţia (5). Desfăşurarea în proporţie egală a reacţiilor (2) şi (5) poate duce la cîturi de cel mult 2,5. Concentraţia succinatului este mult prea mare faţă de aceea a malatului sau a fumaratului care eventual ar putea exista în sistem.

Rezultă că, chiar dacă suprapunerea reacţiilor (2) şi (5) contribuie într-o anumită măsură la creşterea cîturilor P/O pînă la valori peste 2, această suprapunere ar putea fi eventual mai accentuată la început şi apoi scade în timp, în ciuda faptului că în primele minute de incubare concentraţiile relative ale fumaratului şi malatului sînt net în defavoarea unei asemenea suprapuneri.

Influenţa preincubării asupra cîtului P/O. Pentru a verifica dacă formarea în mediul de incubaţie a produşilor de oxidare ai succinatului are vreo influenţă asupra cîtului P/O, în special în primele minute, am făcut preincubări de 25 min în mediul de reacţie, fără adaos de hexokinază şi glucoză. În acest interval de timp consumul de oxigen este aproximativ jumătate din consumul de oxigen în prezenţa hexokinazei şi glucozei. Din consumul de oxigen, care în aceste condiţii este de circa 2,8μatomi (faţă de circa 5,8μatomi în prezenţa hexokinazei), deducem că în mediu s-au putut forma circa 2,8 μmoli fumarat + malat. La adăugarea hexokinazei şi glucozei se constată o activare a respiraţiei la valorile corespunzătoare condiţiilor fosforilante. Pentru cîturile P/O am obţinut în asemenea condiţii valori aproape identice cu cele obţinute fără preincubare. Datele sînt arătate în tabela 2 (menţionăm că datele obţinute în

Tabela 2

Influenţa preincubării mitocondriilor asupra valorii cîtului P/O

Mediul de incubaţie ca în tabela 1 ; temperatura 25°C. Unele cupe au fost preincubate 25 min la 25°C, fără hexokinază şi glucoză

Nr. experienţei	Preincubare	Timpul de incubare min				
		7	12	17	22	27
1	—	2,98	2,30	2,12	2,08	2,04
	+	2,60	2,08	1,75	1,89	1,93
2	—	—	2,49	2,23	2,15	—
	+	—	2,55	2,20	2,21	—
3	—	—	2,35	2,13	1,95	—
	+	—	2,47	2,29	2,14	—

probele cu și fără preincubare corespund aceluiași preparat mitocondrial). Se vede că valorile cîturilor P/O nu sînt sensibil mai mari și că valoarea mare nu persistă mai mult timp decît în cazul probelor care nu au fost preincubate. Dacă preincubarea a fost făcută în absența aerului, se obțin aceleași rezultate ca și în cazul preincubării în aerobioză.

Datele de acest fel arată că formarea în mediul de reacție a produșilor de oxidare ai succinatului nu are practic vorbind, influență notabilă asupra variației valorii cîtului P/O cu timpul.

Desfășurarea în timp a captării fosfatului anorganic. Scăderea în timp a valorii cîtului P/O se datorește de fapt micșorării vitezei de captare a fosfatului anorganic, în timp ce viteza consumului de oxigen rămîne liniară, așa cum rezultă din figura 1, în care au fost reprezentate rezultatele unei experiențe tipice. În ordonată s-a înscris numărul de μmoli de fosfat anorganic dispărut din mediu și numărul de μatomi de oxigen consumat; în abscisă s-a înscris timpul după care s-au făcut determinările. Se vede că în primele minute avem de-a face cu o captare de fosfat cu viteză mult mai mare decît în minutele următoare. Panta curbei este mult mai mare în intervalul 0—8 min decît în intervalele următoare. Consumul de oxigen rămîne practic liniar. De fapt, această primă perioadă este faza hotărîtoare pentru valoarea mare a cîtului P/O.

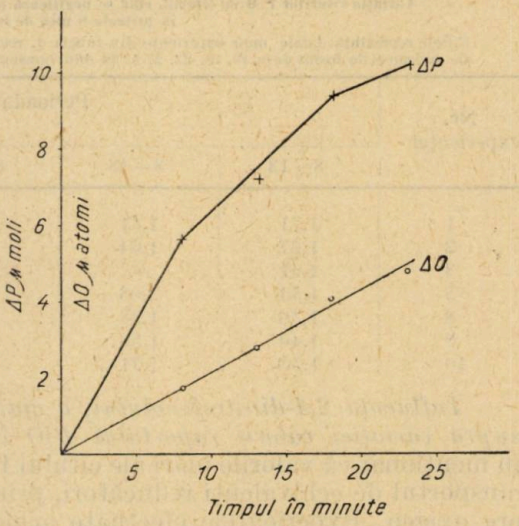


Fig. 1. — Variația în timp a consumului de oxigen și a esterificării fosfatului anorganic (experiența 9 din tabela 1). Mediul de incubație ca în tabela 1; temperatura 25°C. Cupele au fost scoase din baie la timpurile indicate. Reacția a fost oprită cu 1 ml acid tricloracetic 20%.

La concluzia că acesta este factorul determinant al valorii cîtului P/O am ajuns și pe baza unor experiențe în care măsurarea consumului de oxigen și fosfat a fost începută după 7 min de preincubare în prezența hexokinazei și glucozei. Într-o astfel de experiență, valorile cîturilor obținute au fost următoarele: 1,66 la 11 min, 1,33 la 16 min, 1,48 la 21 min, 1,53 la 26 min și 1,48, la 31 min. După cum se vede cîturile au valori sub 2 și sînt relativ constante în timp.

La același rezultat se ajunge și dacă la calcularea valorii cîtului P/O se neglijează fosfatul anorganic esterificat și oxigenul consumat în primele minute. Aceasta s-a făcut scăzînd din cifrele obținute la diferite timpuri pe cele corespunzătoare fosfatului și oxigenului consumat în primele minute. Recalculînd în felul acesta unele cîturi date în tabela 1, se obțin datele

specificate în tabela 3. Ceea ce iese în evidenţă în primul rînd este că raporturile P/O au valori sub 2 şi rămîn relativ constante în timp.

Tabela 3

Variaţia cîturilor P/O cu timpul, cînd se neglijează oxigenul consumat şi fosfatul esterificat în primele 8 min de incubare

Cifrele reprezintă datele unor experienţe din tabela 1, recalculate scăzînd din valorile pentru consumul de oxigen şi de fosfat de la 13, 18, 23, 27 şi 30 min, consumul de oxigen şi de fosfat din primele 8 min

Nr. experienţei	Perioada de incubaţie min				
	8—13	8—18	8—23	8—27	8—30
1	1,71	1,61	1,64	—	1,51
2	1,67	1,64	1,76	1,66	1,45
3	1,41	—	1,62	—	1,54
5	1,84	2,08	1,68	—	1,76
8	1,36	1,98	2,04	—	—
9	1,40	1,56	1,49	—	—
10	1,53	1,71	1,62	—	—

Influenţa 2,4-dinitrofenolului, a cianurii de potasiu şi a anaerobiozei asupra variaţiei valorii raportului P/O în timp. În nota precedentă [2] am menţionat că valorile mari ale cîtului P/O la 20 min sînt condiţionate de transportul de echivalenţi reducători, prin lanţul respirator, de la substrat spre oxigen. Experienţele efectuate acolo aveau timpuri de incubare de circa 20 min. De data aceasta am reluat aceste experienţe folosind timpuri de incubare mai scurte (8—13 min). Rezultatele obţinute sînt menţionate în tabela 4. Se vede că valorile cîturilor P/O sînt egale în toate cazurile

Tabela 4

Influenţa 2,4-dinitrofenolului, cianurii de potasiu şi anaerobiozei asupra raportului P/O

Mediul de incubaţie ca în tabela 1. Temperatura 25°C

Adaosuri	8 min			13 min		
	Δ P μ moli	Δ O μ atomi	P/O	Δ P μ moli	Δ O μ atomi	P/O
2,4-Dinitrofenol 0,05 mM	+1,4	1,60	0,0	+1,0	3,06	0,0
KCN 1 mM	+0,9	0,0	0,0	+0,9	0,0	0,0
Anaerobioză	+0,8	—	0,0	+0,8	—	0,0

cu 0, fie din cauza decuplării, fie din cauza blocării funcţionării lanţului respirator. Aceste rezultate demonstrează că şi captarea masivă de fosfat de la începutul perioadei de incubare este dependentă de fosforilarea legată de lanţul respirator. Ea reprezintă o parte integrantă a acestui proces.

DISCUŢIA REZULTATELOR

Comparînd rezultatele prezentate în această lucrare cu cele prezentate în lucrarea precedentă, s-ar părea că ele sînt contradictorii. Într-adevăr, primele rezultate sprijină ipoteza că valorile mari pentru cîturile P/O

sînt determinate de suprapunerea reacțiilor (2) și (5). Trebuie semnalat însă că ele s-au obținut în determinări făcute la circa 20 min de incubare. După cum se vede însă din datele prezentate aici, valoarea cîtului P/O nu este independentă de timp (tabela 1).

Faptul că în primele 8 min cîturile P/O au valori de circa 3 este greu de interpretat dacă s-ar admite că este vorba numai de suprapunerea reacțiilor (2) și (5). Chiar la 13 min cîtul mai are uneori valori de 2,5. Aceasta ar însemna ca în aceste intervale de timp să avem de-a face, în cea mai mare parte, cu fosforilări pe seama unor substrate DPN-dependente care, conform datelor clasice dau cîturi P/O egale cu 3. Acest lucru este însă incompatibil cu situația existentă în cazul incubărilor în prezența succinatului în exces. Cantitatea de fumarat, respectiv malat, care s-a putut acumula în timpul perioadei de echilibrare termică este mult prea mică pentru a se substitui în totalitate succinatului și a acapara astfel întreaga capacitate funcțională a lanțului respirator [8]. Împotriva acestei posibilități pledează și datele obținute cu mitocondrii preincubate timp de 25 min înainte de adăugarea hexokinazei. În aceste experiențe cantitatea de fumarat sau malat care s-a putut acumula este de circa 2,5—2,8 μmoli (valoare corespunzătoare consumului de oxigen din această perioadă, dacă considerăm că oxidarea succinatului a avut loc numai pînă la fumarat). S-a văzut însă că în aceste condiții cîturile nu sînt diferite ca valoare și au aceeași tendință de variație ca și cele obținute cu mitocondrii nepreincubate.

Admițînd totuși că interferența ar determina acest fenomen, pare curios faptul că, o dată începută în primele minute, ea nu mai continuă în timp, în ciuda faptului că cantitatea de fumarat și malat crește, iar cantitatea de succinat scade. Într-adevăr, dacă la început a existat în cupă numai succinat (20 μmoli în 2 ml volum de reacție), după 20 min cantitatea de succinat a scăzut la aproximativ 15 μmoli, adică la 75% din cantitatea inițială. Fumaratul + malatul acumulat a putut să ajungă, eventual, pînă la 25% din cantitatea de succinat. Cu toate acestea, la sfîrșit valoarea cîtului P/O scade, ca și cum posibilitatea interferenței ar dispărea cu timpul.

Suprapunerea reacțiilor (2) și (5) poate contribui într-o anumită măsură la creșterea valorii cîtului P/O. Aceasta este demonstrată categoric de experiențele cu amital, în care cîturile scad la valori sub 2. Suprapunerea singură, însă, nu poate explica două fapte : de ce cîturile P/O cu succinat 10 mM au valori peste 2,5 chiar la timpuri de incubare de 10 min, și de ce viteza de captare a fosfatului anorganic din mediu scade ca și cînd în timp ar dispărea capacitatea mitocondriilor de a efectua reacția (5) paralel cu reacția (2).

Menționăm că fenomenul acesta de captare masivă a fosfatului anorganic, în primele minute după adăugarea hexokinazei și glucozei, l-am observat și cu substrate DPN-dependente.

Comparînd mai atent datele din tabela 1 cu cele din tabela 3 și cu graficul din figura 1, iese în evidență un aspect foarte important. Din tabela 1 rezultă că valoarea cîtului scade în timp, ca și cum ar fi vorba de o pierdere *treptată* a capacității de captare a fosfatului anorganic din

mediu. Din figura 1 iese în evidență că viteza de esterificare a fosfatului este mult mai mare la început decît în minutele următoare. Din tabela 3 însă, reiese că dacă la calcularea valorii cîtului P/O nu se iau în considerare fosfatul și oxigenul consumați în primele minute, cîtul P/O rămîne relativ constant, ca și cînd valorile cîturilor P/O din tabela 1 ar fi alcătuite din doi termeni. Un termen constant, reprezentat de valorile ce rămîn după scăderea fosfatului în perioada inițială, și un termen variabil. Valoarea acestuia din urmă ar fi determinată de fapt de repartizarea excesului de fosfat anorganic captat în primele minute pe o perioadă mai scurtă sau mai lungă. Contribuția sa este, astfel, mai mult sau mai puțin importantă la determinarea valorii cîtului P/O la un moment dat, în funcție de durata incubării.

Comparînd valorile obținute prin recalcularea cîturilor, așa cum s-a făcut pentru datele din tabela 3, cu valorile cîturilor P/O obținute cu amital (tabela 2 din [2]), observăm că ele se apropie mult ca mărime (în ambele cazuri cîturile au valori de circa 1,7). Pe de altă parte, unele experiențe preliminare ne-au arătat că dacă se fac determinări ale cîtului P/O după diferite timpuri de incubație în prezența amitalului (1 mM), valoarea cîturilor scade de asemenea în timp. Valoarea de la 7—8 min (după 8 min de preincubare a mitocondriilor în prezența amitalului în perioada de echilibrare termică) continuă însă să rămînă mai mare de 2. Valorile *) cîtului P/O scad însă repede la cele obținute cu succinat în prezența amitalului. Situația este aproape identică în cazul folosirii succinatului în concentrații mari (30 mM).

Rezultate ca acestea ne întăresc convingerea că, de fapt, problema cîtului P/O la succinat este mult mai complexă și că valorile mari ale cîtului P/O în primele minute nu pot fi explicate numai prin prisma oxidării mai avansate a succinatului. Credem că în realitate este vorba de două fenomene distincte care se suprapun, concurînd în același sens la creșterea valorii cîtului P/O. Unul dintre acestea este oxidarea mai avansată a succinatului, al doilea ar putea fi fosforilarea cu randament energetic ridicat.

În ce privește concordanța dintre valorile date în tabela 3 și cele obținute cu amital, este necesar să precizăm că nu considerăm cîtuși de puțin că ele ar fi datorite în mod obligatoriu acelorași cauze. Există probabilitatea ca și aici să fie vorba de acțiunea a doi factori diferiți, care sînt influențați în același sens. Amitalul abolește fosforilarea legată de oxidarea substratelor DPN-dependente [9], care eventual ar putea lua naștere din succinat. Aceste fosforilări ar reprezenta unul din factorii implicați [3]. Cel de al doilea factor ar putea fi mult mai labil, care devine inoperant de la sine prin prelungirea timpului de incubație. El ar putea fi reprezentat probabil printr-o etapă suplimentară de fosforilare, existentă în porțiunea terminală a lanțului respirator [6], [7], [10]. Acest din urmă punct îl luăm în considerare, deocamdată, mai mult ca o ipoteză de lucru, deoarece în momentul de față nu avem date experimentale proprii suficiente, care să constituie o dovadă directă a contribuției sale.

*) Citățm cîteva valori : experiența 1. $\Delta P = 2{,}5$ μ moli ; $\Delta O = 1{,}12$ μ atomi ; $P/O = 2{,}21$. Experiența 2. $\Delta P = 3{,}91$ μ moli ; $\Delta O = 1{,}71$ μ atomi ; $P/O = 2{,}28$.

CONCLUZII

Cîturile P/O cu succinat 10 mM sînt variabile în timp, scăzînd de la valori de circa 3 în primele minute, pînă la valori de circa 1,7 după 30 min de incubare.

În primele minute de incubare viteza captării fosfatului anorganic este mult mai mare decît în perioadele următoare.

Valorile mari ale cîtului P/O cu succinat, la timpuri mai lungi de incubare, sînt determinate de măsura în care fosfatul anorganic a fost captat în primele minute.

Captarea masivă de fosfat anorganic în primele minute este un fenomen care depinde de funcționarea lanțului respirator fosforilant, fiind abolită de prezența decuplanților sau a inhibitorilor transportului de electroni.

S-ar părea că ipoteza oxidării mai departe a fumaratului rezultat din succinat nu poate explica *singură* creșterea valorii cîtului P/O cu succinat la valori de ordinul celor obținute de noi. Este probabil ca în primele minute de incubare să fie operantă și o etapă de fosforilare suplimentară, existentă în porțiunea terminală a lanțului respirator.

Prezentată la redacție la
31 martie 1962

Laboratorul de biochimie,
Facultatea de medicină, București

ВЛИЯНИЕ, ОКАЗЫВАЕМОЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ИНКУБАЦИИ НА ЗНАЧЕНИЕ ОТНОШЕНИЯ ФОСФОРЕЛИРОВАНИЯ В ПРИСУТСТВИИ СУКЦИНАТА

РЕЗЮМЕ

При работах с митохондриями, выделенными из печени крыс и подверженными инкубации в присутствии сукцината (10 мМ), авторы получали значения отношения P/O, снижающиеся во времени, от значений, находящихся примерно около 3 в первые 7—8 мин., до примерно 1,7 через 30 мин. инкубации. Большое значение отношения P/O определяется связыванием неорганического фосфата, протекающим с повышенной скоростью в течение первых минут. Это вызвано фосфорелированием, связанным с действием дыхательного цикла. В присутствии 2,4-динитрофенола или же ингибиторов переноса электронов в дыхательный цикл (цианистый калий 1 мМ или анаэробиоз) связывание неорганического фосфата среды полностью приостановлено.

Возможно, что большие значения отношения P/O вызваны также окислением некоторых субстратов, зависящих от DPN. Если подобное явление имеет место, это происходит лишь в первые минуты. Одновре-

менное протекание реакций фосфорелирующего окисления сукцината до фумарата и подобных реакций субстратов, зависящих от DNP, не может полностью объяснить очень большое значение отношения P/O, наблюдаемое в течение первых минут. Возможно, что в этот период действует дополнительный фосфорелирующий этап, свойственный конечной стадии дыхательного цикла.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКА

Рис. 1. — Изменение во времени потребления кислорода и этерификации неорганического фосфата (Опыт 9, таблица 1). Инкубационная среда как в таблице 1; температура 25°С. Чашечки вынимали из ванны в указанные промежутки времени. Реакцию остановили 1 мл 20 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты.

INFLUENCE DE LA DURÉE D'INCUBATION SUR LA VALEUR DU RAPPORT DE PHOSPHORYLATION AU SUCCINATE

RÉSUMÉ

Sur des mitochondries isolées du foie de rat et incubées au succinate 10 mM les auteurs obtiennent pour les quotients P/O des valeurs décroissantes avec le temps : d'environ 3 pour les premières 7—8 minutes, jusqu'à environ 1,7 après 30 minutes d'incubation. Les grandes valeurs initiales sont dues à la captation du phosphate inorganique, qui se déroule plus rapidement dans les premières minutes. Ce phénomène est déterminé par la phosphorylation liée à son tour au fonctionnement de la chaîne respiratoire. En présence du 2,4-dinitrophénol ou des inhibiteurs du transport d'électrons dans la chaîne respiratoire (cyanure de potassium 1 mM ou anaérobiose), la captation du phosphate inorganique du milieu est complètement abolie.

En outre, il est possible que les grandes valeurs du rapport P/O soient déterminées aussi par l'intervention de substratums en dépendance du DPN. Si ce phénomène a lieu, cela ne peut arriver que dans les premières minutes. La superposition des réactions de l'oxydation phosphorylante du succinate jusqu'au fumarate avec des réactions similaires de certains substratums dépendants du DPN ne peut cependant expliquer à elle seule la très grande valeur du quotient pendant les premières minutes. Il est probable qu'une étape phosphorylante supplémentaire soit opérante au début, étape qui existerait dans la portion terminale de la chaîne respiratoire.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Variation avec le temps de la consommation d'oxygène et de l'estérification du phosphate inorganique (expérience 9 du tableau 1).

Mili eu d'incubation comme dans le tableau 1 ; température 25°C. Les coupes ont été retirées du bain aux temps indiqués. La réaction a été arrêtée avec 1 ml d'acide trichloracétique 20 %.

BIBLIOGRAFIE

1. C. GURBAN, E. CRISTEA, Studii şi cercetări de biochimie, **4**, *4*, 551 (1961).
2. C. GURBAN, E. CRISTEA, Studii şi cercetări de biochimie, **5**, *3*, 415 (1962).
3. P. GREENGARD, K. MINNAERT, E. C. SLATER, J. BETEL, Biochem. J., **73**, 637 (1959).
4. D. B. TYLER, J. Biol. Chem., **216**, 395 (1955).
5. D. B. TYLER, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **88**, 333 (1955).
6. J. RAMIREZ, A. MUJICA, Feder. Proc., **20**, 49 (1961).
7. R. D. DALLAM, R. B. HOWARD, Biochim Biophys. Acta., **37**, 188 (1960).
8. O LINDBERG, L. ERNSTER, în *Protoplasmatologia*, **III/A$_4$**, Springer, Viena, 1954, 43.
9. L. ERNSTER, în *The Structure and function oj subcellular components*, Cambridge, 1959, 54.
10. B. CHANCE, G. HOLLUNGER, Feder Proc., **20**, 50 (1961).
11. H. A. KREBS, A. RUFFO, M. JOHNSON, L. EGGLESTON, R. HEMS, Biochem. J., **54**, 107 (1953).
12. R. WHITTAM, W. BARTLEY, G. WEBBER, Biochem. J., **59**, 590 (1955).
13. H. LÖW, P. SIEKEVITZ, L. ERNSTER, O. LINDBERG, Biochim Biophys. Acta, **29**, 392 (1958).
14. B. CHANCE, B. HAGIHARA, Al V-lea Congres de biochimie, Moscova, 1961, *Simposium intracellular respiration and phosphorilation.*

BIOCHIMIA CREIERULUI

I. SEPARAREA FOSFOLIPIDELOR DIN CREIER PE COLOANĂ DE SILICAGEL. DETERMINAREA VITEZEI DE REFACERE A DIFERIȚILOR COMPONENȚI FOSFOLIPIDICI, FOLOSIND IZOTOPI RADIOACTIVI (^{14}C)

DE

I. F. DUMITRU

În ultimii ani, studiul compoziției lipidice a creierului și al metabolismului diferiților componenți lipidici ocupă un loc însemnat în cercetarea biochimică. Creierul este organul cel mai bogat în lipide, compoziția acestora fiind în acest organ extrem de heterogenă. Mai mult de jumătate din fracția lipidelor totale (10—11 g%), o formează fosfolipidele, compuși organici puțin studiați din punct de vedere chimic și biochimic.

Conținutul bogat al creierului în fosfolipide se datorește, pe de o parte, faptului că acestea sînt elemente plastice, structurale ale țesutului nervos, iar pe de altă parte, după cum reiese din cercetările efectuate în ultimul deceniu de biochimiștii sovietici, [27], [40], [41], [15], [17], [32], [16] metabolismul fosfolipidelor cerebrale este strîns legat de starea funcțională a sistemului nervos.

Primele cercetări sistematice efectuate asupra compoziției lipidelor din creier [38], [39] s-au bazat pe principiul extracției selective a acestora cu ajutorul solvenților organici. Timp îndelungat metodele obținerii de preparate lipidice pure, atît din creier cît și din alte organe, ca și metodele chimice de dozare a lipidelor în obiectele biologice, au rămas nesatisfăcătoare. Marea labilitate a acestor compuși, capacitatea lor de a se oxida ușor, pericolul de contaminare cu alți componenți tisulari, ca și cu produsele de oxidare a lipidelor constituie impedimentul principal în studiul acestora.

Utilizarea pe scară tot mai largă a izotopilor radioactivi în cercetarea biochimică, în special în domeniul biochimiei creierului, pune în fața cercetătorului numeroase probleme de ordin metodic, și în primul

rînd obținerea în stare pură a componenților ale căror particularități metabolice urmează să fie studiate. Această problemă este deosebit de importantă în cazul folosirii în cercetare a compușilor organici marcați cu ^{14}C.

Importante succese în studiul fosfolipidelor în organismul animal au fost obținute în ultimul deceniu, cînd atît metodele chimice cît și cele fizico-chimice au fost sistematic perfecționate. Metodele noi de obținere a preparatelor lipidice și fosfolipidice pure din țesutul cerebral [11], [9], [10], metoda hidrolizei alcaline a extractului cloroformic descrisă și folosită [4], precum și metodele chimice de dozare a diverșilor componenți fosfolipidici în obiectele biologice [24], [25], [1],[19], [2], [3] au favorizat în mod considerabil cercetarea, îmbogățind cunoștințele noastre cu privire la compoziția chimică a fosfolipidelor cerebrale, prin descrierea de noi componenți din țesuturile organismului animal și îndeosebi din creier. Totuși, cu toate avantajele lor față de metodele vechi, metodele amintite mai sus sînt parțial corespunzătoare sau nesatisfăcătoare în cazul folosirii izotopilor radioactivi care posedă o radiație β-slabă, ca de exemplu ^{14}C.

Posibilitatea obținerii de componenți fosfolipidici în stare pură și determinarea ulterioară a vitezei lor de refacere a fost oferită de folosirea cromatografiei fosfolipidelor pe coloană [37], [12], [42], [8], [40], [31],[33], precum și a cromatografiei pe hîrtie [22], [34], [18].

Metoda de separare a fosfolipidelor din extractul tisular hepatic al șobolanului și bovinelor pe coloană de acid silicic [13] a găsit o largă întrebuințare în cercetările asupra compoziției lipidice a sîngelui și ficatului [7], [28], [26], [14], [23], [36]. Cromatografia pe coloană de acid silicic a fost de asemenea folosită pentru recromatografierea preparatelor fosfolipidice cerebrale obținute după cromatografia lor pe coloane de AlO_2 [20], [21].

În lucrarea de față ne propunem să descriem o metodă de separare a fosfolipidelor din creier cu ajutorul cromatografiei pe coloană de silicagel și care să permită determinarea ulterioară a vitezei de refacere a diferiților componenți fosfolipidici în cazul folosirii ^{14}C ca indicator radioactiv.

La baza metodei descrise de noi stă principiul eluției succesive a fosfolipidelor cu diferite mixturi de cloroform-metanol, folosit anterior de Hanahan și colaboratori [13]. Partea teoretică a lucrării de față a fost publicată în altă parte [5].

MATERIAL ȘI METODĂ

Montarea experiențelor. Experiențele au fost efectuate pe șobolani albi în greutate de 80—120 g. Acetatul de sodiu, marcat cu ^{14}C pe gruparea carboxilică, s-a injectat animalelor subcutanat din calculul 30 μC la 100 g greutate. În timpul experiențelor animalele au fost introduse într-un exsicator unit cu ajutorul pompei de apă cu un sistem de adsorbenți ai bioxidului de carbon radioactiv respirat de animale. După 1 oră de la injectarea preparatului radioactiv animalele au fost sacrificate prin introducerea în aer lichid. Creierul a fost rapid extras din cavitatea cranială, curățat de membranele aderente și vasele sangvine mari, după

îndepărtarea prealabilă a cerebelului. Creierii a 3—4 şobolani au fost reuniţi şi în stare congelată maceraţi atent în mojar pînă la obţinerea unei pulberi amorfe albe, perfect omogenă — omogenatul ţesutului cerebral.

Următorii parametri biochimici au fost determinaţi: activitatea specifică (imp/min/mg C) a omogenatului ţesutului cerebral; activitatea specifică a carbonului fracţiei lipidelor totale; conţinutul procentual al componenţilor fosfolipidici din creier şi activitatea lor specifică; conţinutul fracţiei lipidelor totale şi fosfolipidelor din ţesutul cerebral.

Activitatea specifică a carbonului radioactiv în omogenatele ţesutului cerebral şi în fracţia lipidelor totale s-a determinat conform metodei descrisă de Prohorova şi Tupikova [29]. Cantitatea fracţiei lipidelor totale s-a dozat după o metodă gravimetrică propusă de Folch şi colaboratori [9], [10], iar precipitatul lipidic obţinut a fost folosit în continuare pentru dozarea radioactivităţii.

Dozările radioactive au fost efectuate cu ajutorul instalaţiei „B-2", contorul Geiger-Müller avînd o sensibilitate de 2 mg/cm^2.

Obţinerea extractului fosfolipidic. Extracţia fosfolipidelor din ţesutul cerebral s-a efectuat, în principiu, după metoda lui Vladimirov, Ivanova şi Rubel [40], bazată pe precipitarea repetată a omogenatului ţesutului cerebral cu acid tricloracetic în scopul îndepărtării complete a fosforului anorganic şi acido-solubil.

Probele de ţesut cerebral, 1 g, s-au precipitat cu 10 ml de acid tricloracetic 5% la temperatura de 0°C şi apoi s-au centrifugat. Lichidul supernatant a fost decantat. Precipitările au fost în continuare efectuate cu acid tricloracetic 2,5% pînă la completa îndepărtare a radioactivităţii. Precipitatul obţinut a fost spălat de 7—10 ori cu apă distilată la 0°C, cu scopul completei îndepărtări a urmelor de acid tricloracetic, care pot prejudicia determinarea radioactivităţii specifice a componenţilor chimici cercetaţi.

În continuare precipitatul a fost tratat cu acetonă şi eter dietilic, cîte 5 ml la 1 g ţesut iniţial. După aceea extracţia fosfolipidelor a fost efectuată, în decurs de 3 min la 60 °C, cu 20 ml alcool etilic-eter dietilic 3 :1, mixtură proaspăt preparată. Extractele au fost colectate şi extracţia continuată cu 30 ml cloroform-metanol 1 :1, timp de 30 min la temperatura de 64,5°C.

Extractele începînd cu cel acetonic, după centrifugare, au fost colectate într-un balon cotat şi în toate cazurile aduse la un volum cunoscut cu dietileter.

Din extractul fosfolipidic obţinut au fost recoltate probe pentru dozarea fosforului fosfolipidic total după metoda Fiske şi Subbarow. Restul extractului fosfolipidic a fost evaporat pe o baie de apă la temperatura de 60—65°C în curent de azot sau CO_2. După evaporare a fost dizolvat în 10 ml cloroform şi transportat pe o coloană de silicagel.

Separarea fosfolipidelor pe coloană de silicagel. Coloana constă dintr-un tub de sticlă (2,5 × 25 cm) dotat cu un filtru de sticlă şi un rezervor cu o capacitate de 750 ml. Silicagelul, special preparat pentru cromatografie (uzinele ICECHIM Dudeşti, Bucureşti), a fost macerat pînă la obţinerea unei pulberi fine cu o granulaţie de 80—100 mesh. După aceea silicagelul a

fost eliberat de impurități prin spălarea repetată cu solvenți organici (hexan, eter de petrol, metanol, cloroform), uscat la temperatura camerei, iar apoi activat prin încălzire la 105°C timp de 20—24 ore în termostat. De obicei, 20 g silicagel, în solventul care va fi primul utilizat pentru fracționarea fosfolipidelor, au fost folosite pentru încărcarea coloanei,

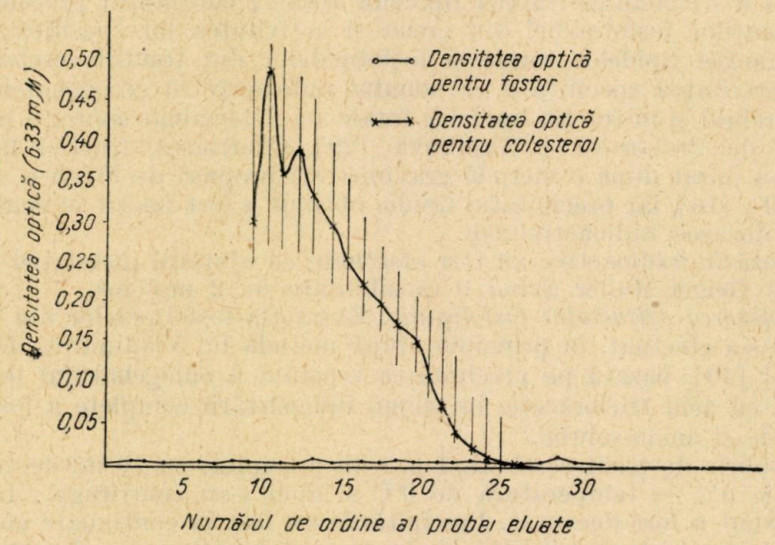


Fig. 1. — Curba de eluție a colesterolului din extractul fosfolipidic obținut din creier și adsorbit pe coloană de silicagel.

care s-a efectuat cu 2—4 ore înainte de începerea eluției și adsorbția extractului pe coloană. Este absolut necesar ca coloana de silicagel să fie compactă, să nu conțină bule de aer ; repartiția omogenă a silicagelului în coloană și gradul de stabilitate al acesteia sînt condiții necesare pentru o bună fracționare a fosfolipidelor.

Soluția extractului fosfolipidic, care conține de la 1,8 la 4,5 mg P, a fost transportată în coloană foarte prudent, evitîndu-se agitarea suprafeței silicagelului sau obținerea unei suspensii a silicagelului în soluție. După adsorbția extractului fosfolipidic, pe straturile superioare ale silicagelului, coloana se conectează la un colector automat de fracții de tipul LKB și procesul eluției fosfolipidelor din coloană durează 15—18 ore.

În experiențele noastre eluția s-a efectuat cu ajutorul cloroformului (p.a.) și diferitelor mixturi de cloroform și metanol în ordinea următoare : cloroform (250—450 ml), cloroform-metanol 4 : 1 (500 ml), cloroform-metanol 3 : 2 (750 ml) și cloroform metanol 1 : 4 (500 ml).

În funcție de cantitatea inițială de material și corespunzător valorii fosforului fosfolipidic din extract, cantitățile de solvenți utilizați pentru eluția fosfolipidelor pot varia în limite cunoscute. Viteza de eluție a fost de 2 ml/min și s-au colectat fracții de cîte 10 ml.

În experiențele cu izotopi radioactivi marcați cu ^{14}C este absolut necesară eliberarea extractului fosfolipidic de impuritățile de natură

lipidică, ca de exemplu colesterol, esterii acizilor graşi cu glicerina, acizii graşi liberi etc. Aceşti componenţi, care însoţesc fosfolipidele în timpul extracţiei lor din ţesut cu solvenţi organici, pot să denatureze tabloul activităţii specifice a componenţilor de natură fosfolipidică şi în special a acelor componenţi care sînt eluaţi de prima mixtură, cloroform-metanol 4 : 1.

În scopul îndepărtării componenţilor mai sus enumeraţi din extractul fosfolipidic adsorbit pe coloană s-a utilizat eluţia extractului cu cloroform. În probele eluate s-a dozat colesterolul şi fosforul. Rezultatele sînt reprezentate în figura 1.

După cum se vede din figura 1 colesterolul este eluat în întregime cu 250 ml cloroform, iar fosforul nu este prezent în aceste probe.

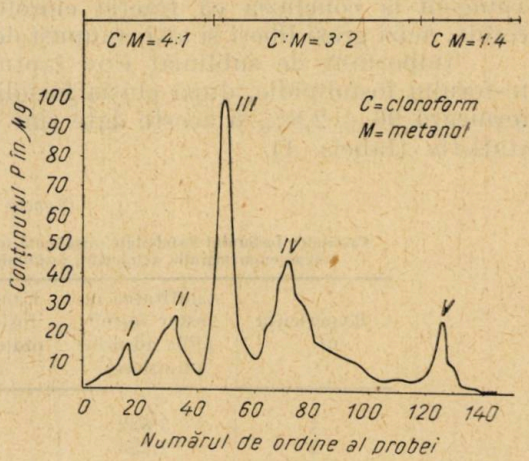


Fig. 2. — Curba repartiţiei componenţilor fosfolipidici din creier, obţinută după cromatografia extractului fosfolipidic (1 g ţesut cerebral).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Curbele de repartizare a diferiţilor componenţi fosfolipidici, obţinute după cromatografierea extractului fosfolipidic din creier, sînt reprezentate grafic în figurile 2 şi 3.

În figura 2 este reprezentată curba de separare a fosfolipidelor obţinute dintr-un singur creier de şobolan (1 g). Reacţiile cantitative (Lieberman-Burchard şi reacţia hidroxamică) au scos în evidenţă prezenţa unor cantităţi apreciabile de colesterol şi acizi graşi în fracţiile I şi II. Datorită faptului că acizii graşi încorporează ^{14}C în molecula lor, iar colesterolul măreşte coeficientul de absorbţie al preparatelor obţinute din aceste fracţii în scopul determinării activităţii lor specifice, a fost necesară purificarea prealabilă a extractului fosfolipidic de aceşti componenţi. În acest scop am folosit cloroformul, curba de separare a fosfolipidelor, după cum se vede din figura 2, păstrîndu-şi caracteristicile anterioare.

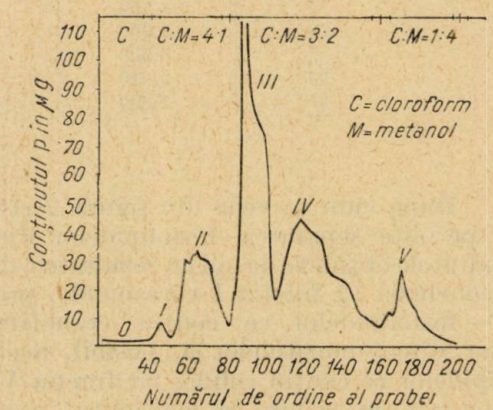


Fig. 3. — Separarea componenţilor fosfolipidici din creier după eluţia extractului din coloană cu cloroform.

Lipidele neutre, care sînt reprezentate în creier, în mod principal, prin colesterol și acizi grași au fost eluate din coloana de silicagel cu ajutorul a 250—300 ml cloroform, lipsind total din fracțiile I și II.

Comparînd datele noastre cu cele publicate recent de alți autori [36] ajungem la concluzia că fracția cloroformică conține colesterol, triglyceride, acizi grași liberi și alți compuși de natură lipidică.

Important de subliniat este faptul că randamentul procentual al fosforului fosfolipidic, după eluția fosfolipidelor din coloana de silicagel, formează 96 ± 2,8% și aceste date sînt concludente din punct de vedere statistic (tabela 1).

Tabela 1

Cantitatea fosforului fosfolipidic (exprimată în %) eluat din coloana de silicagel după cromatografia extractului fosfolipidic din creierul de șobolan

Experiența nr.	Cantitatea de fosfor fosfolipidic adsorbit pe coloană	Cantitatea de fosfor fosfolipidic eluat din coloană	Randamentul %
1	3,832	3,759	97
2	2,125	1,913	90
3	1,688	1,631	96,6
4	1,375	1,347	98
5	2,000	1,823	91
6	4,600	4,500	98
7	4,450	4,365	98
8	2,200	2,250	102,0
9	3,500	3,100	91,5
10	2,010	1,912	96,0
11	1,850	1,800	97,5

Valoarea medie 96,0 ± 2,8

După cum se vede din figura 2 cromatografia pe coloană de silicagel permite separarea fosfolipidelor din creier în 5 fracții. Comparînd rezultatele obținute de noi cu rezultatele din literatură [13],[7],[28] ajungem la concluzia că fracția I corespunde, probabil, acizilor fosfatidici, fracția II — fosfolipidelor ce conțin etanolamină, fracția III — serinfosfatidelor, difosfoinozitidelor și, posibil, acetalfosfolipidelor, fracția IV — fosfolipidelor ce conțin colină, iar fracția V — sfingomielinelor. Datele experimentale cu privire la conținutul procentual al componenților fosfolipidici din creier, obținute după separarea fosfolipidelor, sînt reprezentate în tabela 2.

Din rezultatele expuse mai sus reiese că fosfolipidele ce conțin colină (lecitinele) sînt componentul principal al fosfolipidelor din creier, ele reprezentînd 45% din totalul acestora. Urmează apoi fosfolipidele ce conțin etanolamină — 20,4%, sfingomielinele care formează 7,2% și acizii fosfatidici care reprezintă 2,1% din totalul fosfolipidelor din creier. Restul (23%) revine fracției III compuse din serinfosfatide, difosfoinozitide și fosfolipide care conține forma acetalică a etanolaminofosfolipidelor.

Datele experimentale obținute de noi, cu privire la conținutul procentual al fracțiilor I, II, IV și V, sînt în deplină concordanță atît

Tabela 2

Corelațiile cantitative ale fracțiilor fosfolipidice din creier, exprimate în procente față de fosforul fosfolipidic total

Experiența nr.	Fracția				
	I	II	III	IV	V
1	3,0	26,4	24,4	44	3,8
2	1,5	21,0	24,8	46	7,1
3	2,0	19,5	28,4	44,5	5,8
4	2,0	23,3	24,0	47	4,1
5	2,4	18,8	28,0	39	5,0
6	2,3	19,5	20,6	44,3	13,0
7	1,0	20,0	26,0	46	8,0
8	4,1	21,9	24,0	44	6,0
9	2,1	18,1	18,0	50	12,0
10	2,0	19,0	16,0	44	9,0
11	1,8	19,0	22,0	48	11,0
12	1,3	19,1	23,0	45,5	12,0
Valorile medii	2,1	20,4	23,0	45	7,2

Indicii statistici: I — $\sigma = \pm$ 0,75; m = 0,3;
II — $\sigma = \pm$ 2,38; m = 0,68;
III — $\sigma = \pm$ 3,74; m = 1,08;
IV — $\sigma = \pm$ 2,69; m = 0,77;
V — $\sigma = \pm$ 3,39; m = 0,98.

cu cele obținute prin metoda hidrolizei extractelor cloroformice ale fosfolipidelor din creierul de ovine [4], cît și cu cele care au utilizat cromatografia pe hîrtie pentru separarea fosfolipidelor din creierul de șobolan [3].

În ceea ce privește fracția III pe viitor va fi necesară recromatografierea ei avînd în vedere o selecție corespunzătoare a condițiilor și solvenților organici necesari eluției.

Determinările, în care s-a urmărit activitatea specifică a omogenatului țesutului cerebral și fracției lipidelor totale, au arătat că activitatea specifică a ultimelor formează, aproximativ, 70% din activitatea specifică a omogenatului. Dacă activitatea omogenatului, calculată pentru 1 g țesut, este considerată 100%, atunci carbonul radioactiv al fracției lipidelor totale din creier formează 51—62% din carbonul radioactiv total găsit în țesutul cerebral. Prin urmare, după 1 oră de la injectarea acidului acetic radioactiv, aproximativ jumătate din carbonul radioactiv total al acestuia este încorporat în lipidele din creier. Datele noastre corespund cu cele obținute de alți autori [30], [35].

În experiențele asupra separării fosfolipidelor din creier și dozării activității specifice a diferiților componenți fosfolipidici, am stabilit că fracția lipidelor neutre, eluate cu cloroform, posedă o considerabilă viteză de refacere. Activitatea specifică a acestei fracții, calculată pentru 1 mg substanță, este de 50 imp/min. Trebuie să ținem seama însă, că colestero-

lul care este parte componentă a acestei fracții, se reface foarte încet în creierul animalelor adulte [35]. Deci activitatea specifică a fracției lipidelor neutre crește simțitor dacă luăm în considerare acest ultim fapt.

În ceea ce privește însă activitatea specifică a componenților fosfolipidici, cea mai mare viteză de refacere o posedă lecitinele (48 imp/min/mg substanță), apoi fosfolipidele ce conțin etanolamină (43 imp/min/mg) și o viteză de refacere cu totul neînsemnată — sfingomielinele. Fracția III (difosfoinozitidele + serinfosfatidele + acetalfosfatidele) ocupă o poziție de mijloc între fosfolipidele ce conțin colină și etanolamină și, probabil, activitatea ei specifică (29 imp/min/mg) este micșorată de prezența serinfosfatidelor care se refac destul de încet.

Cercetările ulterioare, efectuate pe animale mature, au confirmat în întregime datele experimentale expuse mai sus [6].

În prezent se continuă cercetările cu privire la studiul vitezei de refacere a componenților fosfolipidici în organismul animal în creștere.

CONCLUZII

Cromatografia pe coloană de silicagel permite separarea clară a fosfolipidelor din creier în 5 fracții: I — acizii fosfatidici, II — fosfolipide ce conțin etanolamină, III — fracția compusă din difosfoinozitide, serinfosfolipide și probabil, acetalfosfolipide, IV — fosfolipide ce conțin colină și V — sfingomieline. Randamentul procentual al fosforului după cromatografierea fosfolipidelor este de 96 $\pm$ 2,8%, ceea ce demonstrează valabilitatea metodei pentru cercetarea fosfolipidelor din creier.

S-a stabilit conținutul procentual al diferiților componenți fosfolipidici din creier. Fosfolipidele ce conțin colină sînt componentul principal, ele reprezentînd 45% din fosfolipidele totale. Urmează apoi fosfolipidele ce conțin etanolamină — 20,4%, sfingomielinele — 7,2%, acizii fosfatidici — 2,1%, restul de 23% revenind fracției compusă din difosfoinozitide, serinfosfolipide și acetalfosfolipide.

Experiențele preliminare și datele obținute au arătat că metoda de față poate fi utilizată cu succes pentru studiul vitezei de refacere a principalilor componenți fosfolipidici din creier în cazul folosirii carbonului radioactiv ^{14}C.

Prezentată la redacție la
30 martie 1962

Laboratorul de chimie biologică al Facultății de științe naturale, București
și
Laboratorul de metabolism „E. S. London", Universitatea de Stat din Leningrad

БИОХИМИЯ МОЗГА

I. РАЗДЕЛЕНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ МОЗГА НА КОЛОНКЕ СИЛИКАГЕЛЯ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ ОБНОВЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ ПРИ ПОМОЩИ РАДИОАКТИВНЫХ ИЗОТОПОВ (^{14}C)

РЕЗЮМЕ

В данной статье описывается метод хроматографии фосфолипидов головного мозга на колонке силикагеля, позволяющий разделить фосфолипидный экстракт мозга на пять фракций: I — фосфатидные кислоты, II — этаноламиносодержащие фосфолипиды, III — фракция, состоящая из дифосфоинозитидов, серинфосфолипидов и, вероятно, ацетальфосфолипидов, IV — холинсодержащие фосфолипиды и V — сфингомиэлины. Выход метода составляет 96%.

Количественные соотношения разных фракций фосфолипидов следующие: I — 2,1%, II — 20,4%, III — 23%, IV — 45,5% и V — 7,2%. что согласуется с литературными данными других авторов [4], [18], [34].

Применяя радиоактивный углерод в виде уксуснокислого натрия, меченного на карбоксильной группе, автор в предварительных опытах нашел, что из основных представителей фосфолипидов наиболее быстро обновляются холинсодержащие фосфолипиды, затем этанол-аминосодержащие фосфолипиды и совсем незначительно — сфингомиэлины. Было также обнаружено, что нейтральные липиды, которые экстрагируются из мозга вместе с фосфолипидами, обладают достаточно большой скоростью обновления по сравнению с общей фракцией липидов и отдельными фракциями фосфолипидов.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Кривая элюирования холестерола из фосфолипидного экстракта, полученного из мозга и адсорбированного на колонке силикагеля.

Рис. 2. — Кривая распределения фосфолипидных компонентов мозга, полученная после хроматографирования фосфолипидного экстракта (1 г мозговой ткани).

Рис. 3. — Разделение фосфолипидных компонентов мозга после элюирования экстракта в колонке хлороформом.

BRAIN BIOCHEMISTRY

I. SEVERING OF PHOSPHOLIPIDS OF THE BRAIN IN SILICAGEL COLUMN. DETERMINATION OF RECOVERING SPEED IN PHOSPHOLIPID COMPOUNDS BY MEANS OF RADIOACTIVE ISOTOPES (^{14}C)

ABSTRACT

A cromatographic severing method of brain phospholipids in a silicagel column is described. By this method 5 fractions may be obtained: I — phosphatidic acids, II — phospholipids containing etanol-

amine, III — a fraction of diphosphoinozitids serinphospholipids and probably acetylphospholipids, IV — phospholipids containing choline and V — sphyngomyeline.

The productivity of this method is 96 percent of the total lipidic phosphorus.

The quantitative ratios of the various phospholipidic fractions are as follows: I — 2.1%, II — 20.4%, III — 23%, IV — 45.5% and V — 7.2%. These are in agreement with the data recorded in the speciality literature by other investigators [4], [18], [34].

In these preliminary experiences radioactive carbon was used under the form of sodium acetate, labelled according to the carboxilic group. Thus it has been demonstrated that from the range of basic phospholipids, those which recover most intensely are the phospholipids containing colina, and then the phospholipids containing etanolamine. Spyngomyelines are rather slowly recovering. It was also demonstrated that the fraction of neutre phospholipids extracted from the brain together with the phospholipids reveal a remarkable recovery speed as compared to various phospholipidic fractions and to the fraction of total lipids.

LIST OF FIGURES

Fig. 1. — Cholesterol elution curve from the phospholipidic extract of the brain and adsorbed on silicagel column.

Fig. 2. — Distribution curve of the brain's phospholipidic compounds obtained according to the cromatograph of the phospholipidic extract (1 g cerebral tissue).

Fig. 3. — Severing of phospholipidic compounds of the brain according to the extract elution of a chloroform column.

BIBLIOGRAFIE

1. AXELRAD I., REICHENTHAL J., BRODIE B. B., *The direct determination of phosphatidil ethanolamine and phosphatidyl serine in plasma and red blood cells*, J. Biol. chem., **204**, 903 (1953).
2. DAWSON R.M.C., *A note on the Estimation of Sphingomyelin in Nervous Tissue*, Biochem. J., **56**, 621 (1954).
3. DAWSON R.M.C., *The measurement of ^{32}P-labeling of individual kephalins and Lecithin in a Small Samples of Tissue*, Biochem. Biophys. Acta, **14**, 374 (1954).
4. DAWSON R. M. C., *A Hydrolytic Procedure for the Identification and Estimation of Individual Phospholipids in Biological Samples*, Biochem. J., **75**, 45 (1960).
5. ДУМИТРУ И. Ф., *Скорость обновления отдельных компонентов фосфолипидов в головном мозгу*, Тезисы докладов конференции по вопросам гипоксии и биохимии нервной и мышечной систем, Ленинград, 1962, **17**.
6. DUMITRU I. F., *Biochimia creierului. II. Studiul vitezei de refacere a fracției lipidelor totale și principalilor componenți fosfolipidici din creier cu ajutorul carbonului radioactiv ^{14}C* (sub tipar).
7. ETIENNE J., POLONOVSKI J., *Evolution des lipides au cours de l'incubation du serum III. Etude des phospholipides*, Bull. Soc. Chem. Biol., **42**, 857 (1960).
8. FILLERUP D. L., MEAD J. F., *Chromatographyc separation of the Plasma Lipids*, Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., **83**, 574 (1953).

9. FOLCH J., ASCOLI I., LEES M., MEATH J. A., LE BARON F. N., *Preparation of Lipide Extracte from Brain Tissue*, J. Biol. chem., **191**, 833 (1951).
10. FOLCH I., LEES M., SLOANE STANLEY G. H., *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue*, J. Biol. chem., **226**, 497 (1957).
11. FOLCH. J., *Complete fractionation of brain cephalin isolation; from it of phosphatidyl serine, phosphatidyletanolamine and diphosphoinositide*, J. Biol. chem., **177**, 497 (1948).
12. HANAHAN D. J., TURNER M. B., JAIYKO M. E., *The isolation of egg phosphatidyl choline by in adsorption column technique*, J. Biol. chem., **192**, 623 (1951).
13. HANAHAN D. J., DITTMER J. C., WARASHINA E., *A column chromatographic separation of classes of phospholipides*, J. Biol. chem., **228**, 685 (1957).
14. HIRSH J., AHRENS E. A., *The separation of complex Lipide Mixtures by the Use of Silicic Acid chromatography*, J. Biol.. chem,, **233**, 311 (1958).
15. КОМЕТИАНИ П. А., *Исследование распределения и превращения фосфорилхолина, этаноламинофосфата и глютаминовой кислоты в головном мозгу*, в *Биохимия нервной системы*, Изд. АН УССР, Киев, 1954, 98.
16. КОМЕТИАНИ П. А., ТКЕШЕЛАШВИЛИ Л. К., ОВСЯНКО Т. А., *Обмен фосфорных эфиров холина и этаноламина в головном мозгу*, *Вопросы биохимии нервной системы*, Изд. АН УССР, Киев, 1957, 69.
17. КРЕПС Е. М., СМИРНОВ А. А., ЧЕТВЕРИКОВ А. Д., *Новые данные по сравнительному изучению фосфорного обмена в разных отделах мозга и при разных функциональных состояниях, вызванных кислородным голоданием мозга*, в *Биохимия нервной системы*, Изд. АН УССР, Киев, 1954, 125.
18. КРЕПС Е. М., МАНУКЯН К. Т., СМИРНОВ А. А., ГИРКОВСКАЯ Е. В., *Фосфолипиды мозга в онтогенезе позвоночных*, Тезисы докладов конференции по вопросам гипоксии и биохимии нервной и мышечной систем, Ленинград, 1962, 24.
19. LEA C. H., RHODES D. M., *Phospholipids 2. Estimation of amino-nitrogen in intact phospholipids*, Biochem. J., **56**, 613 (1954).
20. LONG C., STAPLES D. A., *Chromatographic Isolation of the Ethanolamine-containing Phospholipids by of Rat Brain*, Biochem. J., **75**, 16 p. (1960).
21. LONG C., SHAPIRO B., STAPLES D. A., *Chromatographic Separation of Serine-containing Phospholipids of Rat Brain*, Biochem. J., **75**, 17 p. (1960).
22. MARINETTI G. V., STOTZ E., *Paper chromatographic separation of Phospholipids*, J. Amer. chem. Soc., **77**, 1955 (1955).
23. MARINETTI G. V., ERBLAND J., STOTZ E., *Phospholipids of Pig Heart Cell Fractions*, J. Biol. chem., **233**, 562 (1958).
24. MC KIBBIN J. M., TAYLOR W. E., *The Nitrogenous constituents of the tissue lipides. I. The extraction, purification and hidrolysis of tissue lipides*, J. Biol. chem., **178**, 17 (1949).
25. MC KIBBIN J. M. TAYLOR W. E., *The Nitrogenous constituents of the tissue lipides. II. The determination of sphingosine of tissue lipides extracts*, J. Biol. chem., **178**, 29 (1949).
26. NEWMAN H. A. I., MC CANDLESS E. L., ZILVERSMIT D. B., *The synthesis of C^{14} Lipids in Rabbit Atheromatous Lesions*, J. Biol. chem., **236**, 1264 (1961).
27. ПАЛЛАДИН А. В., *Итоги и задачи исследований в области биохимии головного мозга*, *Биохимия нервной системы*, Изд. АН УССР, Киев, 1954, 7.
28. PAYSANT-DIAMENT M., POLONOVSKI J., *Incorporation in vitro du P^{32} dans les phospholipides globulaires du sang humain*, Bull. Soc. chim. biol., **42**, 337 (1960).
29. ПРОХОРОВА М. И., ТУПИКОВА З. Н., *Методы определения радиоактивного углерода*, Изд. ЛГУ, Ленинград, 1959.
30. ПРОХОРОВА М. И., МАТВЕЕВА И. М., ПУТИЛИНА Ф. Е., СОКОЛОВА Г. П., *Скорость обновления некоторых пластических и энергетических веществ в головном мозгу*, Сб. *Нервная система*, 1960, *2*, 22.
31. RHODES D. H., *The chromatographic separation of phospholipids*, Chem. et Ind., 1956, 1010.
32. СКВИРСКАЯ Э. Б., СИЛИГ Т. П., *Сравнительное изучение нуклеиновых кислот и фосфолипидов в нервной системе*, в *Вопросы биохимии нервной системы*, Изд. АН УССР, Киев, 1957, 51.
33. СМИРНОВ А. А., ГИРКОВСКАЯ Е. В., *Раздельное изучение обмена фосфолипидов*, в *Вопросы биохимии нервной системы*, Киев, 1957, 83.

34. Смирнов А. А., Гирковская Е. В., Манукян К. Г., *Изучение фосфолипидов разных отделов мозга крысы с применением метода хроматографии на бумаге*, Биохимия, **26**, *6*, 1027 (1961).
35. Соколова Г. П., *Обмен уксусной кислоты в организме и её участие в синтезе липидов мозга*, Вестник Лен. Ун-та, **21**, 128 (1959).
36. Schwartz H. P., Dreisbach L., Barrionuevo M., Rleschick A., Kostyk I., *The Effect of Ionizing Irradiation on the Lipid Compozition of the Liver Mitochondria of Rat*, Arch. Biochem. Biophys., **92**, 133 (1961).
37. Taurog A., Entenman C., Fries B. A., Chaikoff I. L., *An adsorption procedure for the separation of choline-containing from non-choline-containing phospholipids of liver*, J. Biol. chem., **155**, 19, (1944)
38. Thudichum J. L. W., *A Treatise on the chemical constitution of the Brain*, London, 1884.
39. Thudichum J. L. W., *Die Chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere*, Tübingen, 1901.
40. Владимиров Г. Е., Иванова Т. Н., Рубель А. Н., *Скорость обновления фосфора в фосфолипидах мозга крыс в состоянии покоя и при возбуждении центральной нервной системы*, Труды Ин-та физиологии им. И. П. Павлова, **V**, 409 (1956).
41. Владимиров Г. Е., *Ход обновления фосфоросодержащих соединений в мозговой ткани в условиях практического сна и при возбуждении центральной нервной системы*, в *Биохимия нервной системы*, Изд. АН УССР, Киев, 1954, 25.
42. Zechmeister L., *Progress in Chromatography*, London, 1950.

VITEZA DE PEROXIDARE A OMOGENATELOR DE ȚESUTURI LA IRADIEREA *IN VITRO*

DE

M. FURNICĂ și M. SPIRIDON

În apariția bolii actinice, studiul formării și acumulării peroxizilor lipidici prezintă un interes indiscutabil, pentru elucidarea mecanismului tulburărilor metabolice [1]. Două aspecte trebuie luate în considerație pentru aceste studii : pe de o parte influența pe care acești peroxizi o exercită asupra diferitelor procese biochimice, iar pe de altă parte rolul pe care diferitele organe îl joacă în inducerea bolii de iradiere.

Într-o lucrare anterioară [2] am arătat că la iradierea locală *in vivo* a șobolanilor, efectul asupra stării generale a animalului și asupra acizilor nucleici din diferitele țesuturi neiradiate, care se găsesc la distanță de locul iradiat, se manifestă cu intensități diferite, în funcție de organul iradiat ; la iradierea creierului, efectele toxice ale radiațiilor asupra întregului organism sînt mult mai mari decît la iradierea locală a splinei, deși splina este considerată un organ mult mai radiosensibil decît creierul.

Dat fiind rolul fiziologic important al lipidelor celulare, în lucrarea prezentă am abordat problema gradului de legătură între creșterea peroxizilor lipidici și intensitatea bolii actinice. Am considerat că viteza crescută de formare a peroxizilor lipidici în anumite organe ar putea constitui o explicație a rolului pe care aceste organe îl joacă în apariția bolii de iradiere.

Ca model experimental am utilizat iradierea *in vitro* a omogenatelor de țesuturi și dozarea ulterioară a peroxizilor lipidici din țesuturi, imediat după iradiere și după 1 și 2 ore de la iradiere.

Partea experimentală. Experiențele au fost efectuate pe țesuturi de șobolan, omogenizate la aparatul Potter, în NaCl 0,14 M, în concentrație finală de 20%. S-au dozat peroxizii lipidici în următoarele țesuturi : creier, ficat, rinichi, splină, mucoasă intestinală, tumoră Jensen. Fiecare omogenat de țesut a fost împărțit în două probe : o probă a fost supusă iradierii, iar proba neiradiată a constituit proba martor.

Iradierea s-a efectuat la aparatul RUM, cu care s-a administrat doza de 12 000 R sau 25 000 R. Omogenatele de ţesuturi, martori sau probe, au fost menţinute pe gheaţă în tot timpul experienţei, pentru a evita descompunerea peroxizilor iniţiali.

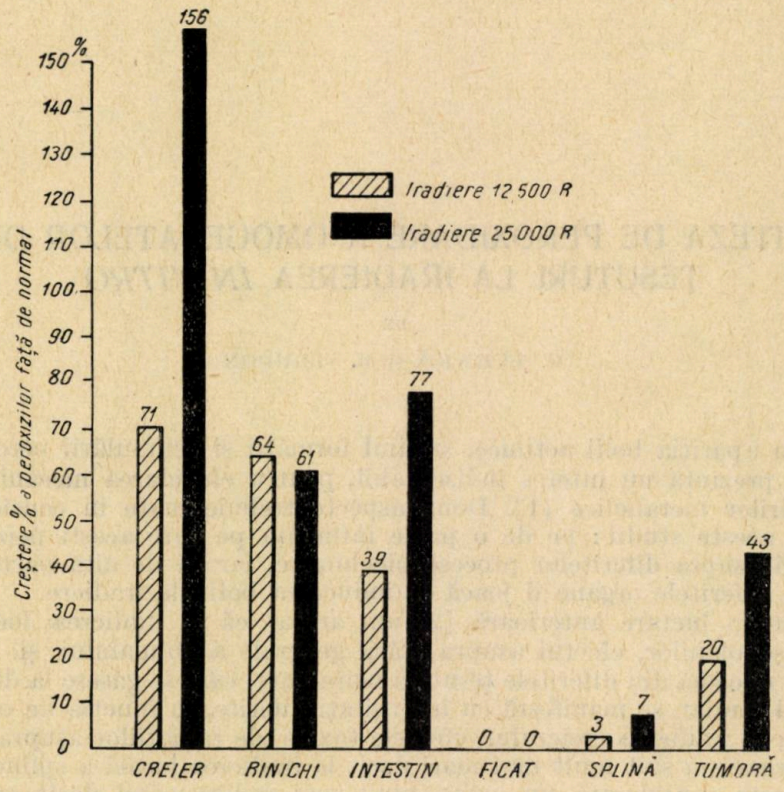


Fig. 1. — Peroxizii lipidici din ţesuturile iradiate, dozaţi imediat după iradiere.

După iradiere, imediat şi după 1 şi 2 ore, s-au dozat peroxizii lipidici, spectrofotometric, prin metoda cu acid 2-tiobarbituric [3].

Rezultatele sînt exprimate în E (extincţie) produsă la 530 mμ de 200 mg ţesut normal sau iradiat.

Rezultate. În figurile 1, 2 şi 3 sînt prezentate rezultatele dozării peroxizilor lipidici la diferite intervale de la iradiere. Fiecare cifră reprezintă media a 10 determinări.

Din figura 1 rezultă că *imediat* după iradiere se formează o cantitate importantă de peroxizi lipidici în creier, rinichi, mucoasa intestinală şi tumora Jensen. În ficat şi splină, după acest interval nu pot fi decelaţi peroxizi lipidici prin testul cu TBA.

Se constată de asemenea că formarea peroxizilor lipidici creşte o dată cu dublarea dozei de radiaţii, în creier, mucoasa intestinală şi tumora Jensen.

După *o oră* de la iradiere (figura 2) cantitatea de peroxizi lipidici rămîne la aceleași valori crescute ca în cazul efectuării experienței imediat după iradiere. Important după acest interval este apariția peroxizilor lipidici în omogenatul de ficat.

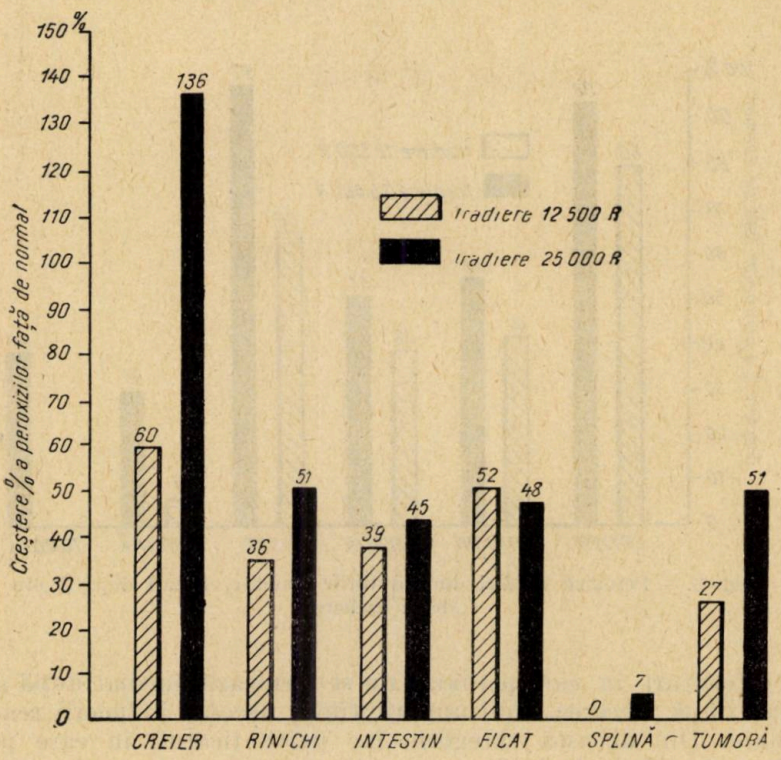


Fig. 2. — Peroxizii lipidici din țesuturile iradiate, dozați după 1 oră de la iradiere.

În splină nu se observă o creștere semnificativă a peroxizilor lipidici nici după o oră de la iradiere.

Dozînd peroxizii lipidici după *2 ore* de la iradierea țesuturilor, se constată că în splină peroxizii lipidici încep să crească numai în cazul iradierii cu 25 000 R (figura 3).

Discuții : Iradierea *in vitro* a omogenatelor de țesuturi și dozarea ulterioară a peroxizilor lipidici a arătat că viteza de formare a peroxizilor lipidici depinde în primul rînd de *natura* țesutului respectiv. Din acest punct de vedere țesuturile pot fi împărțite astfel :

1) Țesuturi în care peroxizii cresc imediat după iradiere și se acumulează în cantități maxime, astfel încît dacă efectuăm determinarea după 1 sau 2 ore nu găsim o creștere a peroxizilor față de momentul inițial. Dintre aceste țesuturi fac parte creierul, rinichiul și intestinul.

În categoria ţesuturilor care se peroxidează imediat după iradiere intră şi tumorile. În general, se constată că tumora Jensen neiradiată conţine o cantitate de peroxizi lipidici mult mai mare decît ţesuturile normale; după iradiere, creşterea cantităţii de peroxizi lipidici este mai mică decît în ţesuturile normale studiate.

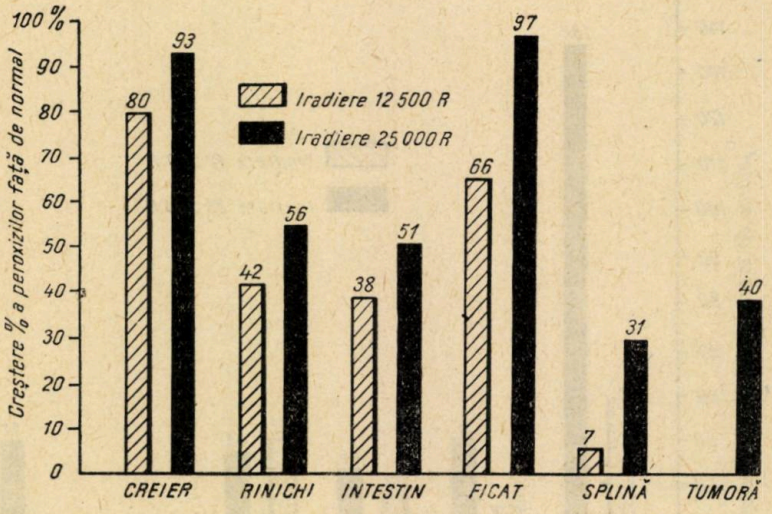


Fig. 3. — Peroxizii lipidici din ţesuturile iradiate, dozaţi după 2 ore de la iradiere.

2) Ţesuturi în care peroxizii nu se formează imediat după iradiere, ci numai după trecerea unui anumit timp, necesar inducerii reacţiei de peroxidare. Din această categorie fac parte ficatul, în care peroxizii apar după 1 oră de la iradiere, şi splina, în care peroxizii se formează după 2 ore şi numai sub influenţa dozei de 25 000 R.

Un alt factor care influenţează cantitatea de peroxizi formaţi în ţesuturi este mărimea *dozei* de iradiere. Se constată că în creier, intestin şi tumoră, sub acţiunea dozei de 25 000 R, creşterea cantităţii de peroxizi lipidici este dublă faţă de iradierea cu 12 500 R. Ar fi interesant de urmărit care este doza maximă, dincolo de care nu se mai observă o creştere corespunzătoare a peroxizilor şi modul în care ea variază în funcţie de ţesutul respectiv.

Influenţa *timpului* joacă de asemenea un rol important în inducerea reacţiilor în lanţ care au ca rezultat creşterea peroxizilor lipidici în ţesuturi. Este evident, pentru acest caz, modul în care peroxizii lipidici din ficat cresc după 1 şi 2 ore de la iradiere.

Rezultatele prezentate în lucrarea de faţă arată că organul în care are loc peroxidarea cea mai intensă este creierul. Aceste fapte ar putea

explica de ce iradierea locală, *in vivo*, a capului, induce efecte imediate mai puternice decît iradierea splinei.

Prezentată la redacție la
10 aprilie 1962

Laboratorul de enzimologie al Institutului oncologic, București

СКОРОСТЬ ОКИСЛЕНИЯ С ОБРАЗОВАНИЕМ ПЕРОКСИДОВ ГОМОГЕНАТОВ ТКАНЕЙ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ in vitro

РЕЗЮМЕ

Были облучены in vitro дозами в 12 500 R и в 25 000 R ткани крыс и были определены липидные пероксиды 2-тиобарбитуровой кислотой — сразу после облучения, а также через 1 и 2 часа.

Было установлено, что сразу после облучения содержание пероксидов возрастает в мозгу (71% и 156%), в почках (64%), в слизистой кишечника (39% и 77%) и в опухоли Иенсена (20% и 43%). В печени содержание пероксидов увеличивается через час после облучения, а в селезенке через 2 часа.

Различные скорости окисления тканей рассматриваются в связи с оказываемым на организм влиянием при местном облучении различных органов.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Липидные пероксиды в облученных тканях, определенные сразу после облучения.

Рис. 2. — Липидные пероксиды в облученных тканях, определенные через час после облучения.

Рис. 3. — Липидные пероксиды в облученных тканях, определенные через 2 часа после облучения.

LA VITESSE DE PÉROXYDATION DES TISSUS HOMOGÉNÉISÉS LORS DE LEUR IRRADIATION *IN VITRO*

RÉSUMÉ

On a irradié *in vitro*, avec les doses de 12 500 R et 25 000 R, des tissus de rat et on a dosé les péroxydes lipidiques aussitôt après, et 1 et 2 heures après l'irradiation, par la méthode à l'acide 2-thiobarbiturique.

On a constaté qu'immédiatement après l'irradiation les péroxydes augmentent dans le cerveau (71% et 156%), dans les reins (64%), dans la muqueuse intestinale (39% et 77%) et dans la tumeur de Jensen (20% et 43%). Dans le foie cette augmentation a lieu 1 heure après l'irradiation et dans la rate après 2 heures.

On interprète ces différences de la vitesse de péroxydation en relation avec les effets observés dans l'organisme lors de l'irradiation locale de divers organes.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Péroxydes lipidiques des tissus irradiés, dosés immédiatement après l'irradiation.

Fig. 2. — Péroxydes lipidiques des tissus irradiés, dosés une heure après l'irradiation.

Fig. 3. — Péroxydes lipidiques des tissus irradiés, dosés deux heures après l'irradiation.

BIBLIOGRAFIE

1. B. N. TARUSOV, An. rom.-sov., seria med. generală, *3*, 36 (1958).
2. O. COSTĂCHEL, M. FURNICĂ, M. SPIRIDON, Studii şi cercetări de biochimie, **3**, *2*, 149 (1960).
3. Б. Х. Хомутов, Т. А. Гаркуша, Вопросы медицинской химии, **6**, *4*, 43 (1960).

O METODĂ FOTOMETRICĂ PENTRU DOZAREA 11α-HIDROXIPROGESTERONEI DIN MEDII FERMENTATE

DE

D. ONEȘANU

Hidroxilarea microbiologică a steroizilor pregnanici în poziția 11α a căpătat o importanță deosebită, fiind o etapă obligatorie în sinteza cortizonului și prednisonului. Urmărirea procesului de hidroxilare în timp este indispensabilă în vederea realizării unor randamente superioare. Durata relativ redusă a acestui proces (circa 48 ore) atrage după sine folosirea unor metode analitice rapide.

Pentru urmărirea procesului de hidroxilare a progesteronei în poziția 11α, în literatură sînt descrise multe metode convenabile pentru determinarea calitativă și cantitativă a 11α-hidroxiprogesteronei, însă, de regulă, ele prevăd o prealabilă separare cromatografică a steroizilor și deci, implicit, un consum mare de timp. O trecere în revistă a acestor metode este făcută de L. M. Reineke [7].

A. S. Barmenkov [1] indică o metodă rapidă, calitativă, de urmărire a procesului de 11 α-hidroxilare a progesteronei. Metoda nu permite însă determinarea cantitativă a 11 α-hidroxiprogesteronei formate.

Metoda fotometrică prezentată mai jos, se bazează pe reacția de culoare pe care unii steroizi o dau cu acidul sulfuric concentrat [4] și care este folosită de diferiți autori pentru dozarea sau detectarea anumitor steroizi [3], [5], [8]. Reacția nu a fost utilizată pînă în prezent pentru dozarea 11 α-hidroxiprogesteronei din mediile fermentate. Experiențele noastre s-au făcut folosind medii fermentate cu *Rhizopus nigricans*, în condițiile descrise de O. Hanč și colaboratori [2].

Metoda de lucru este următoarea: mediul fermentat este filtrat. Din filtrat se iau 50 ml și se extrag prin agitare în pîlnie de separare de 2 ori cu cîte 50 ml cloroform. Extractele cloroformice se unesc și se spală cu 10 ml soluție $NaHCO_3$ 2% și apoi cu 20 ml apă distilată. Se usucă apoi extractul cloroformic pe 5 g Na_2SO_4 sicc. Din extractul cloroformic deshidratat se iau 2 ml într-o eprubetă și se evaporă la sec pe baia de apă, iar reziduul se dizolvă în 4 ml reactiv etanol-acid sulfuric. Se ține

eprubeta timp de 30 min în apă ce fierbe, apoi se răcește și se măsoară la 500 mμ extincția colorației roșii formate în timpul încălzirii. 500 mμ reprezintă maximul de absorbție al colorației în vizibil.

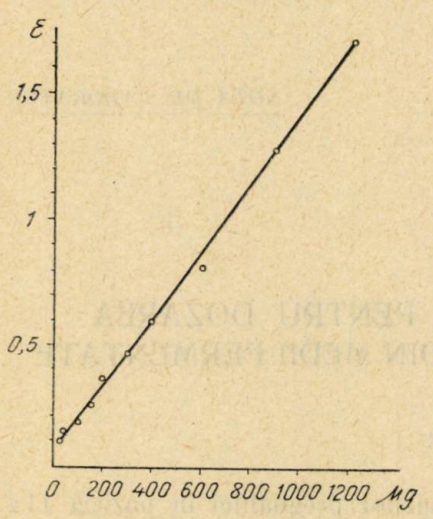


Fig. 1. — Diagrama etalon pentru dozarea 11 α-hidroxiprogesteronei.

Valoarea citită la fotometru permite aflarea cantităților de 11 α-hidroxiprogesteronă din probă cu ajutorul unei diagrame etalon. Domeniul de aplicabilitate al legii lui Lambert-Beer este cuprins între 40 și 1200 μg.

Reactivul etanol-acid sulfuric se prepară adăugînd un volum de H_2SO_4 96% răcit la 0°C, în porțiuni mici și sub agitare, peste un volum egal de etanol de asemenea răcit. Reactivul astfel preparat este stabil la temperatura camerei timp de 2 săptămîni.

Pentru trasarea curbei etalon s-a folosit 11 α-hidroxiprogesteronă cu p.t. = 166—168°C, lucrîndu-se în felul următor: soluții cu un conținut bine determinat de 11α-hidroxiprogesteronă sînt evaporate la sec pe baia de apă și apoi se prelucrează pentru trasarea diagramei în condițiile descrise mai sus.

Se precizează că nici progesterona, ce se poate găsi în mediu nefiind transformată, nici 6β, 11 α-dihidroxiprogesterona, care apare în cantități mici în mediul de fermentație, ca produs secundar [6], nu dau cu reactivul folosit o reacție de culoare în condițiile de lucru descrise.

Temperatura de reacție a fost stabilită prin încercări. La 80°C reacția decurge foarte lent, iar la 120°C se produce o îmbrunare a lichidului, cu dispariția maximului de absorbție din vizibil, după cum reiese din figura 2.

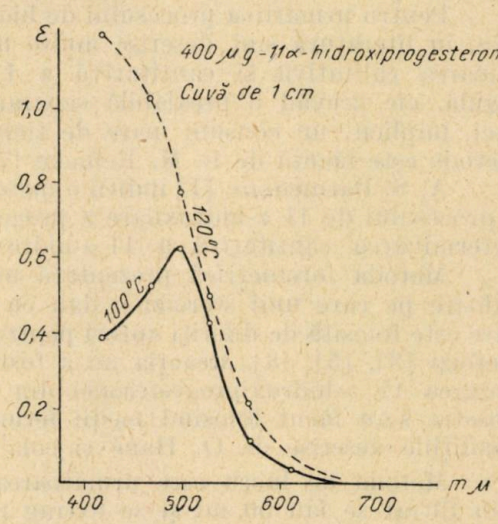


Fig. 2. — Spectrul de absorbție al colorației formate.

Colorația care se obține este stabilă în timp. Printr-o determinare efectuată după o ședere a soluției timp de 24 de ore la temperatura camerei, nu s-a constatat nici o modificare a extincției.

S-a verificat de asemenea dacă mediul de cultură folosit conține substanțe care ar putea să treacă în extractul cloroformic și să dea și ele o coloratie. S-a constatat că asemenea substanțe nu există. Pentru a se verifica dacă în timpul fermentației nu se formează astfel de substanțe, s-au adăugat la un extract cloroformic din medii fermentate cantități bine determinate de substanță pură. Probele obținute s-au dozat fotometric, rezultatele fiind trecute în tabela 1.

Tabela 1

Determinarea 11 α-hidroxiprogesteronei adăugate la un extract cloroformic cu un conținut inițial de 180 μg 11 α-hidroxiprogesteronă

11 α-hidroxiprogesteronă			Eroarea %
adăugată	total în probă	dozată	
60	240	250	+4
120	300	310	+3
240	420	410	−2
300	480	480	−
600	780	800	+2

Metoda fotometrică descrisă a fost comparată cu o metodă cromatografică descrisă în literatură [7]. Diferențele între rezultatele obținute au fost sub 5%.

Metoda fotometrică prezintă avantajul de a fi mult mai rapidă decît metodele cromatografice descrise în literatură, putînd fi folosită în cursul lucrărilor de testare a diferitelor tulpini de *Rhizopus nigricans*, precum și la stabilirea parametrilor optimi de fermentație.

Prezentată la redacție la
7 martie 1962

Secția biosinteze,
Institutul de cercetări
chimico-farmaceutice,
București

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ 11 α-ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА В ПОДВЕРГНУТЫХ БРОЖЕНИЮ СРЕДАХ

РЕЗЮМЕ

В работе предлагается новый фотометрический метод определения 11 α-гидроксипрогестерона, основанный на цветной реакции, которую дает это соединение с реактивом этиловый спирт — серная кислота (1:1). Подвергающуюся реакции смесь нагревают до 100°С в течение 30 мин; экстинкцию определяют для 500 мμ. В описанных условиях реакции, прогестерон и 6β, 11α -дигидроксипрогестерон не дают окрашивания. Метод был применен для определения 11 α-гидроксипрогестерона в средах, подвергнутых брожению в присутствии Rhizopus nigricans.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Диаграмма — стандарт для определения 11 α-гидроксипрогестерона.
Рис. 2. — Спектр поглощения образующейся окраски.

UNE MÉTHODE PHOTOMÉTRIQUE POUR LE DOSAGE DE L'11 α-HYDROXYPROGESTÉRONE DES MILIEUX FERMENTÉS

RÉSUMÉ

On présente une méthode photométrique pour le dosage de l'11 α-hydroxyprogestérone, fondée sur la réaction de couleur que donne cette substance avec le réactif éthanol-acide sulfurique (1 : 1). On chauffe le mélange 30 minutes à 100° et on lit l'extinction à 500 mμ. Dans les conditions de réaction décrites, la progestérone et la 6 β, 11 α-dihydroxyprogestérone ne donnent pas de coloration. La méthode a été appliquée pour le dosage de l' 11 α-hydroxyprogestérone des milieux fermentés au *Rhizopus nigricans*.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Diagramme-étalon pour le dosage de l'11 α-hydroxyprogestérone.
Fig. 2. — Spectre d'absorption de la coloration formée.

BIBLIOGRAFIE

1. Барментов А. С., Ерошин В. К., *Метод контроля процесса гидроксилирования прогестерона в 11α- оксипрогестерон*, Мед. Пром. СССР, **14**, *4*, 40 (1960).
2. Čapek A., Hanč O., Malicova E., *Vliv progesteronu na průběh základnich kvasných křivek u kmene Rhizopus nigricans.* (Influența progesteronei în cursul principalelor curbe de fermentație cu suşa Rhizopus nigricans), Českoslov. Microbiol **2**, *5*, 282 (1957).
3. de Moor P., Steeno O. şi colaboratori *Fluorometric determination of free 11-hydroxycorticosteroids in mor*, Acta Endocrinol., *33*, 297 (1960).
4. Kober S., *Eine kolorimetrische Bestimung des Brunsthormons*, Biochem. Z., *239*, 209 (1931).
5. Mizsei A., Szabo A., *A rapid estimation of prednisolone produced by fermentative oxydation*, J. Biochem. Microbiol. Technol. and Eng., **3**, 2, 119 (1961).
6. Peterson D. H., Murray H. C. şi colaboratori, *Introduction of oxygen at carbon 11 of progesterone*, J. Am. Chem. Soc., *74*, 5933 (1952).
7. Reineke L. M., *Paper chromatography in steroid determination*, Anal. Chem., *28*, 1853 (1956).
8. Sibliková O., Hais I. M., *Přehlet některých barevných a fluorescenčnich detekci steroidů.* (Cîteva reacții de culoare şi fluorescență pentru detectarea steroizilor), Českoslov. Farm. **7**, *1*, 1 (1958).

I. PROBLEME GENERALE. METODE DE CERCETARE

1316. GHIMICESCU GH.şi MUSTEAŢĂ C., *O nouă micrometodă pentru determinarea valorii calorice a alimentelor şi raţiilor alimentare.* Studii şi cercet. chim., 1961, **IX**, *3*, 513—521.

Tehnica propusă pentru stabilirea valorii calorice a alimentelor este bazată pe oxidarea substanţelor organice din alimente cu iodat de potasiu în prezenţa acidului sulfuric la 200°C. Iodul eliberat, şi separat prin antrenare cu vapori de apă, este titrat cu tiosulfat de sodiu.

G. Grigorescu

1317. VASILESCU V., BORDEIANU A., NICULESCU V., CĂPÎLNĂ S. şi GHIZARI E., *Date noi privind compoziţia chimică şi acţiunea biologică a unor extracte de ficat.* Studii şi cercet. fiziol., 1961, **VI**, *4*, 581—589.

Extractele hepatice deproteinizate provenite de la animale supuse hepatectomiei parţiale posedă un rol stimulator asupra metabolismului nucleo-proteinelor celulei hepatice. Acest efect este mult superior aceluia al extractelor obişnuite şi studiul dinamic al valorii extractelor din diferite stadii a arătat că cele mai active sînt obţinute la 24—48 ore de la rezecţie. În compoziţia acestor extracte s-au evidenţiat nucleotide, polipeptide şi o cantitate crescută de aminoacizi care favorizează procesele de transaminare şi transmetilare.

H. D. Schell

1318. HURDUC M. I. şi BRĂTEANU A., *Contribuţii la detecţia histochimică şi histologică a glicogenului cu ajutorul unui nou fixator.* Studii şi cercet. med. Iaşi, 1960, **XI**, *2*, 573—579.

Pornind de la faptul că în decelarea histochimică şi histologică a glicogenului fixatorul are o mare importanţă, autorii preconizează fixarea la 0—4°C, timp de 6 ore, cu alcool metilic saturat cu acid picric la care se adaugă formol, acid acetic, sublimat şi acid salicilic. Fixarea propusă, combinată cu metoda de colorație Best sau Bauer şi acid periodic — leucofuxină, dă rezultate excelente pe ficat, cartilagiu şi epiteliu vaginal.

A. Balcu

1319. RÁCZ G., FÜZI I. şi FÜLÖP L., *Metodă de dozare a conţinutului în arbutină din frunzele de merişor* (Folium vitis idae). Farmacia, 1960, **VIII**, *5*, 377—382.

Metodele descrise în literatură fiind nespecifice, autorii propun o nouă metodă, specifică, care se bazează pe extragerea arbutinei cu apă, îndepărtarea substanţelor de balast, fierbere pentru suspendarea activităţii enzimatice, hidrolizarea arbutinei în mediu acid la cald, oxidarea hidrochinonei rezultate la chinonă, antrenarea acesteia cu vapori de apă şi reducerea din nou la hidrochinonă cu iodură de potasiu, eliminarea iodului pus în libertate, după care se adaugă o cantitate cunoscută de iod şi se titrează excesul cu tiosulfat de sodiu.

D. Moţet-Grigoraş

1320. CSEDÖ C., HORVATH M. şi NAGY SZ., *Metode de determinare a conţinutului în capsaicină din ardei* (Fructus capsici). Farmacia, 1960, **VIII**, *6*, 435—440.

Autorii fac o privire critică a metodelor existente, după care aduc o modificare celei adoptate în standardul de stat 1793—50, propunînd astfel o metodă rapidă şi cu o eroare ce nu depăşeşte 10—12%. Modificarea propusă constă în scăderea cantităţii de metavanadat de amoniu cu care capsaicina dă reacţia de culoare şi în extinderea seriei de comparare între 0—200 mg%.

D. Moţet-Grigoraş

1321. BUCUR M., *Determinarea morfinei din capsulele de mac printr-o metodă de agitare.* Farmacia, 1960, **VIII**, *6*, 447—452.

Se extrage morfina cu un amestec de cloroform şi alcool etilic la un pH în jurul lui 7. După purificare se aduce la sec, se adaugă acid sulfuric, al cărui exces se titrează cu borax. Se poate determina morfina din cantităţi mici de seminţe (pînă la 1 g) cu o eroare de 3%. Solvenţii sînt recuperabili.

D. Moţet-Grigoraş

1322. GHIMICESCU C. şi GHIMICESCU GH., *Contribuţii la studiul identificării şi dozării dinitro-orto-crezolului în urină.* Farmacia, 1961, **IX**, *5*, 309—313.

Dozarea DNOC în urina redusă în prealabil se poate face cu ajutorul reacţiilor Derrien, Mayer, cu fericianură de potasiu, cu nitrit de sodiu şi cu acid sulfovanadic. În condiţiile date aceste reacţii nu sînt interferate de către componenţii normali ai urinei şi nici de pigmenţii biliari. Se recomandă utilizarea metodei cu acid sulfovanadic.

D. Moţet-Grigoraş

1323. RÁCZ-KOTILLA E., *Metode rapide de dozare a conținutului în azulenă din* Flores Millefolii. Farmacia, 1961, **IX**, *10*, 669—674.

Se compară cîteva metode rapide și se aduc unele precizări în tehnica de lucru. Pentru metoda de identificare Stahl se propune să se ia în lucru o cantitate convențională de 0,010 g inflorescențe în loc de un număr definit de capitule, iar pentru observarea în mai bune condiții a colorației în cazul cînd e prea intensă, să se facă diluții. La dozarea din produsul brut se propune utilizarea reacției E.P. modificată în sensul că se vor folosi probe etalon, dozarea făcîndu-se prin comparare. Metoda e rapidă și dă rezultate satisfăcătoare.

D. Moțel-Grigoraș

1324. TĂNĂSESCU GH., ORGHIDAN G. și NIȚULESCU F., *Un nou dezalbuminizant a sîngelui cu material indigen și ieftin cu bună aplicare în biochimia analitică clinică* Fiziol. norm. pat., 1961, *3*, 181—183.

Autorii recomandă ca deproteinizant al serului o soluție de sulfat de sodiu 15% în acid sulfuric 0,1 n.

E. Cristea

1325. MÓDY I., *Glicoproteinele și mucopolizaharidele plasmei sangvine.* Rev. medic., Tg. Mureș, 1961, **VII**, *1*, 74—79.

Referat general fără indicații bibliografice.

D. Moțel-Grigoraș

1326. POPOV I. S., *Conținutul în aminoacizi al produselor furajere.* An. rom.-sov., agr.-zoot., 1962, **XVI**, *1* (65), 133—147.

Pe baza analizei critice a materialelor publicate în literatura sovietică și a altor țări, se expun pe scurt, sub formă de tabele și explicații anexe, datele centralizate asupra conținutului în aminoacizi din 122 feluri de nutrețuri, din care 40 de origine animală și 82 de origine vegetală.

C. Săndulescu

II. BIOCHIMIA PROTIDELOR

III. BIOCHIMIA GLUCIDELOR

1327. VLĂDESCU C., *Cercetări asupra reglajelor metabolismului glucidic la amfibieni. Glicemia normală şi hiperglicemia provocată la* Rana ridibunda. Com. Acad. R.P.R., 1961, **XI**, *8*, 957—965.

Anurele (*Rana ridibunda*) posedă o glicemie scăzută faţă de vertebratele superioare; în inaniţie are valoarea de 30 mg%. Prin administrare de glucoză se produce o hiperglicemie ce durează cîteva ore, apoi dispare prin reglajele metabolice. Se elimină renal — 10%.

G. Grigorescu

IV. BIOCHIMIA LIPIDELOR

V. ENZIME

VI. VITAMINE. HORMONI. ALŢI COMPUŞI BIOACTIVI

1328. MÓZES M., KELEMEN A. şi FESZT GH., *Acţiunea hidrazidei acidului izonicotinic şi a hormonului tiroidian asupra metabolismului gazos.* Rev. medic., Tg. Mureş, 1961, **VII**, *1*, 48—49.

HIN administrată paralel cu un preparat de tiroidă a moderat creşterea consumului de oxigen, atît la animalele normale cît şi la cele tiroidectomizate, efectul hipermetabolizant al hormonului tiroidian nefiind însă suprimat complet prin HIN. După suspendarea administrării extractului tiroidian, injectarea de HIN favorizează revenirea metabolismului gazos la valorile normale. HIN măreşte consumul de oxigen şi la şobolanii tiroidectomizaţi, dar acest efect hipermetabolizant este mai accentuat după un tratament prealabil cu extract tiroidian.

D. Moţet-Grigoraş

VII. BIOCHIMIA MICROBILOR. VIRUSURI. BACTERIOFAGI. ANTIBIOTICE. IMUNOCHIMIE

1329. OERIU I. şi BENESCH H., *Derivaţi de tiouree cu activitate tuberculostatică potenţială. Nota III.* Studii şi cercet. chim., 1961, **IX**, *2*, 343—351.

Au fost sintetizaţi 89 derivaţi de tiouree şi a fost studiată acţiunea lor tuberculostatică faţă de *Mycobacterium tuberculosis H. Ratti* pe mediu Sauton. Sînt indicate în tabele caracteristicile substanţelor sintetizate şi valorile acţiunii lor tuberculostatice.

M. Mănescu

1330. GALEA V., DEAC C. şi STĂNCULESCU V., *Variaţia conţinutului de aminoacizi liberi în produse de carne contaminate cu* B. proteus *şi* B. coli. Rev. igienă, 1961, *4*, 327—332.

S-au cercetat modificările conţinutului de aminoacizi liberi din unele derivate de carne (parizer şi salam italian), în cazul în care ele ar fi infectate cu *B. proteus* şi *B. coli*. Aminoacizii liberi au fost identificaţi cromatografic. S-a constatat că în produsele infectate au dispărut complet aminoacizii: prolina, lizina şi triptofanul, iar în mai mică măsură: valina, fenilalanina şi leucinele. Acţiunea *B. coli* a fost mai accentuată decît a *B. proteus*.

A. Popescu

1331. BLAZSEK V., *Contribuţii la studiul acizilor nucleici virali. I. Acidul ribonucleic infecţios din virusul Coxsackie*. Rev. medic., Tg. Mureş, 1961, **VII**, *1*, 40—44.

Autorul a separat ARN din virusul C şi a arătat că infecţiozitatea ARN este dependentă de puterea ionică şi pH-ul soluţiei tampon utilizate la preparare. Preparatul cel mai activ s-a obţinut la pH-ul 7,0 şi forţă ionică ridicată. Forţa ionică ridicată influenţează de asemenea stabilitatea preparatului. Faptul că ARN viral are o infecţiozitate mai mică decît nucleoproteina virală, s-ar datora îndepărtării parţiale sau totale a proteinei. Diminuarea activităţii nu poate fi pusă pe seama efectului ribonucleazei, deoarece acţiunea inhibitoare a fenolului nu a intensificat activitatea infecţioasă a ARN.

D. Moţet-Grigoraş

1332. RÁCZ G., *Cercetări de antibiotice în cadrul plantelor cu flori*. Rev. medic., Tg. Mureş 1961, **VII**, *2*, 189—194.

Se enumeră antibioticele ce se găsesc în aceste plante, spectrul şi mecanismul de acţiune. Se fac propuneri pentru extinderea şi sistematizarea cercetărilor în acest domeniu. Conţine 46 indicaţii bibliografice.

D. Moţet-Grigoraş

VIII. BIOCHIMIE VEGETALĂ

1333. SIMIONESCU CR. şi CALISTRU E., *Studiul unor transformări chimice în timpul dezvoltării tumorilor produse de* Bacterium Tumefaciens *II. Cercetarea cromatografică a zaharurilor*. Studii şi cercet. chim., Iaşi, 1961, **XII**, *2*, 227—232.

Cantitatea de substanţă vegetală rezistentă la hidroliză este mai mică la ţesutul tumoral faţă de cel sănătos. Ţesutul tumoral conţine cantităţi mai mari de zaharuri decît cel sănătos, iar deoarece mediul tumoral este mai puternic oxigenat, autorii emit ipoteza existenţei unor procese biochimice preferenţiale spre sinteza polizaharidelor.

A. Balcu

1334. SIMIONESCU CR. şi SIMIONESCU N., *Cercetări privind transformările chimice într-o tumoare la* Prunus Cerasifera *var.* Mirabolana. Studii şi cercet. chim., Iaşi, 1961, **XII**, *2*, 233—239.

Se continuă cercetările asupra transformărilor chimice din tumorile existente pe diverşi arbori. În cazul tumorii *Crown Gall* provoacată prin infectare cu *Agrobacterium tumefaciens*, autorii constată o puternică lignificare (19,16 % lignină) şi scăderi corespunzătoare de celuloză. Celuloza din tumoare are un conţinut mai mic de alfa-celuloză decît cea din lemnul sănătos.

A. Bateu

1335. SIMIONESCU CR., CALISTRU E., SIMIONESCU N. şi HRIHOROV M., *Acţiunea antioxidanţilor asupra procesului de dezvoltare a tumorilor vegetale.* Studii şi cercet. chim., Iaşi, 1961, **XII**, *2*, 241—249.

Ca antioxidanţi s-au folosit acidul nordihidroguaiaretic, hidrochinona, acidul galic şi galatul de etil, de propil, octil, dodecil asupra unor probe de rumeguş extrase cu alcool-benzen (1 : 1) sau cu NaOH 1 % şi uscate la vid, din tumoarea *Crown Gall* a tomatelor.Cea mai eficientă se prezintă hidrochinona, care frînează dezvoltarea tumorii şi chiar o dă îndărăt. Ceilalţi antioxidanţi, deşi activi, sînt totuşi mai puţin eficienţi ca hidrochinona. Prevenirea procesului de formare a tumorii prin pretratarea cu antioxidanţi este însoţită de scăderea pronunţată a lignificării, pledînd în favoarea blocării acestui proces în faza sa iniţială. Pentru obţinerea unor rezultate evidente în cazul tumorilor dezvoltate, este necesară o cantitate mare de antioxidant care nu este suportată însă decît rareori de plante.

A. Bateu

1336. SOMMER L., *Izolarea unui ulei volatil din* Herba Equiseti. Farmacia, 1961, **IX**, *2*, 75—81.

Uleiul volatil izolat nu e menţionat în literatură. El se găseşte în proporţie de 172,2—410,9 mg% şi se află localizat în celulele nespecializate din jurul fascicolelor conducătoare. S-au determinat proprietăţile fizico-chimice ale acestui ulei volatil.

D. Moţet-Grigoraş

1337. CONSTANTINESCU E. şi ALBULESCU D., *Izolarea unei alcamine din* Senecio Doria L., Farmacia, 1961, **IX**, *3*, 139—142.

S-a izolat din partea aeriană înflorită o substanţă cu formula brută, $C_7H_{13}O_2N$, probabil de tipul retronecinei. Această substanţă dă reacţii pozitive cu reactivii generali ai alcaloizilor, are p.t. 179—180°C şi este solubilă în apă, acetonă, alcool etilic, metanol, cloroform şi puţin solubilă în eter şi acetat de etil.

D. Moţet-Grigoraş

1338. HERMAN GH., GHEORGHIU A. şi IONESCU-MATIU E., *Contribuţii la studiul valorificării plantei* Hypericum perforatum L. Farmacia, 1961, **IX**, *4*, 227—320.

S-a dozat prin metoda fotocolorimetrică hipericina din diferite probe de *Hypericum perforatum* L. luate din diferite regiuni ale ţării, găsindu-se valori între 0,130 şi 0,308 g% pentru herba şi 0,180 şi 0,480 g% pentru flori. Prin depozitare plantele îşi păstrează conţinutul în hipericină.

D. Moţet-Grigoraş

1339. DICK I., BĂLĂNESCU O. şi POD L., *Contribuţii la studiul influenţei îngrăşămintelor asupra creşterii unor plante medicinale şi asupra dinamicii biosintezei principiilor activi.* Farmacia, 1961, **IX**, *4*, 231—238.

Influenţa îngrăşămintelor asupra biosintezei alcaloizilor din *Atropa belladonna*, *Datura stramonium* şi *Hyoscyamus niger* este practic nulă. Îngrăşămintele azotate determină însă o creştere de recoltă de aproximativ 100%, păstrîndu-se procentul de alcaloizi. Biosinteza glicozidelor din *Digitalis lanata* nu e influenţată de îngrăşămintele minerale, dar sub influenţa superfosfatului plantele se dezvoltă cu 50% mai bine. Îngrăşămintele azotate au o influenţă negativă asupra recoltei. Sub influenţa îngrăşămintelor creşterea alcaloizilor totali din capsulele de *Papaver somniferum* var. *album* este puţin concludentă (10%).

D. Moţet-Grigoraş

1340. RÁCS G., FÜZI I., KISGYÖRGY Z. şi ILIEŞ G., *Contribuţii la cunoaşterea conţinutului în arbutină din produsul indigen* Folium vitis idaeae, Farmacia, 1961, **IX**, *8*, 505—511.

Conţinutul în arbutină variază între 2,66 şi 6,73% în frunze şi între 0,01 şi 0,81% în tulpinile de merişor recoltate din diferite regiuni. Conţinutul cel mai mare se găseşte în lunile septembrie şi octombrie.

D. Moţet-Grigoraş

IX. BIOCHIMIE ANIMALĂ

1341. HARAGUS ST., UZA G., ROSENBERG A., BEDELEANU D. şi OPINCARU A., *Asupra unor modificări serice şi tisulare determinate de clorpromazină în ateromatoza experimentală.* Studii şi cercet. med., Cluj, 1960, *1*, 35—47.

Clorpromazina singură sau asociată cu o alimentaţie suplimentată cu colesterol şi ulei hidrogenat determină, la iepuri, creşteri ale lipidelor serice, oscilaţii ale gama-globulinelor remanieri ale repartizării lipidelor tisulare şi modificări structurale în unele organe. Clorpro-

mazina protejează pereții aortei și ai arterelor mijlocii ale splinei față de infiltrațiile lipidice din ateromatoza experimentală tip Anicicov la iepuri. Se mai observă hiperplazia celulelor reticulare ale splinei, modificări ale vezicii biliare, schițînd în mare vezicula fragă.

C. Gurban

1342. JITARU P. și LAZĂR M., *Variațiile glutationului redus în sîngele cîinilor supuși acțiuni cîmpurilor electromagnetice.* Studii și cercet. biol., șt. agric., Iași, 1961, **XII**, *1*, 101—104

Cîmpul magnetic continuu și cîmpul magnetic pulsator aplicat 5 min zilnic determină într-o primă etapă, la animalele supuse influenței lor, scăderea glutationului redus. În a doua etapă, cîmpul continuu determină o creștere a glutationului redus peste valorile inițiale, iar cîmpul pulsator determină o ușoară creștere care nu atinge însă valorile inițiale, nici chiar după 15 zile de la întreruperea aplicării cîmpului magnetic.

A. Batcu

1343. DOROGAN D. și ROTARU C., *Rolul formației reticulate în corelația dintre excitabilitatea cronaxică și conținutul în albumine hidrosolubile al mușchilor antagoniști.* Studii și cercet. med., Iași, 1961, **XII**, *1*, 71—88.

În mod normal, conținutul în albumine hidrosolubile al mușchilor antagoniști ai gambei și antebrațului cîinelui și iepurelui se găsesc într-un echilibru caracteristic: de constituție și de subordonare. Conținutul total al albuminelor hidrosolubile din mușchii extensori (cu cronaxie scurtă) ai gambei iepurilor este cu 12,96% mai mare decît conținutul analog al mușchilor flexori (cu cronaxie lungă). La mușchii antagoniști ai antebrațului iepurilor cantitatea de albumină din mușchii extensori (cronaxie lungă) este cu 3,5% mai mică decît a mușchilor flexori (cu cronaxie scurtă). La cîine, unde mușchii extensori fie ai antebrațului fie ai gambei au cronaxie mai lungă, conținutul în albumine hidrosolubile este mai mare decît conținutul analog al mușchilor flexori corespunzători. La animalele tratate cu plegomazină se constată o scădere a conținutului în albumine hidrosolubile în mușchii extensori ai cîinelui. La iepurii tratați cu plegomazină cantitatea de albumine hidrosolubile scade la mușchii extensori sub valoarea mușchilor flexori.

A. Batcu

1344. NIȚULESCU I., CHERA GH., SNEER A. și HALER C., *Variațiile echilibrului glicemic la iepuri, provocate prin administrarea de morfină. Caracteristica reflexelor condiționate glicemice asociate.* Studii și cercet. med., Iași, 1961, **XII**, *1*, 111—120.

Autorii au obținut condiționarea hiperglicemiei provocate prin administrarea zilnică de morfină (1 cg pe kg greutate corporală). Reacția hiperglicemiantă la morfină scade progresiv în raport cu repetarea injecțiilor, indicînd apariția unui anumit grad de acomodare.

Administrarea un timp mai prelungit nu a provocat la iepuri apariția de nevoi imperioase de morfină, iar suprimarea bruscă nu a provocat nici o tulburare funcțională.

A. Batcu

1345. CONSTANTINESCU E., NEDELESCU P., CIULEI I. și STĂNESCU M., *Contribuții la acțiunea alantoinei din* Symphytum officinale L. *asupra tumorilor de grefă (Walker și Guérin) la șobolan.* Farmacia, 1961, **IX**, 5, 285—290.

S-a constatat o frînare a evoluției tumorilor la animalele tratate, precum și o scurtă prelungire a vieții. Leucograma arată o ușoară stare leucopenică (caracteristică citostaticelor), producîndu-se mai întîi o ușoară creștere, apoi o scădere de circa 30% sub valoarea inițială. Metastazele la tumoarea Guérin au fost mult frînate. Se impun cercetări asupra acțiunii alantoinei pure.

D. Moțet-Grigoraș

1346. DOROGAN D., FAIGHELIS C. și BATCU A., *Corelația dintre excitabilitatea cronaxică și conținutul mușchilor antagoniști în transaminază glutamico-oxalacetică.* Fiziol. norm. pat., 1961, *1*, 35—40.

Se cercetează corelația dintre excitabilitatea cronaxică și conținutul în transaminază glutamico-oxalacetică al mușchilor antagoniști ai cîinelui și ai iepurelui de casă. La cîine, conținutul în transaminază al mușchilor antagoniști este direct proporțional cu excitabilitatea lor cronaxică; la iepurele de casă se constată același fapt, cu excepția mușchiului flexor al gambei, al cărui conținut în transaminază variază invers proporțional cu excitabilitatea lui cronaxică. Aceste deosebiri ar reprezenta în primul rînd un fenomen de adaptare posturală a animalului la mediul ambiant.

E. Cristea

1347. TEITEL A., SCHWARTZ R. și STROESCU V., *Acțiunea clorpromazinei asupra consumului de oxigen și oxidării glucozei de către creierul de șobolan.* Fiziol. norm, pat., 1961, *1*. 43—47.

Se cercetează efectele clorpromazinei asupra vitezei consumului de oxigen și a oxidării glucozei în omogenatul de creier de șobolan. *In vitro*, clorpromazina în concentrații de 100 mg/ml are o acțiune slabă asupra consumului de oxigen și a oxidării glucozei de către omogenatul de creier de șobolan. Clorpromazina injectată subcutan înainte de sacrificarea animalului, în doze de 10—20 mg/kilocorp, nu influențează consumul de oxigen și oxidarea glucozei; în doze de 50 mg/kilocorp, ea diminuează foarte puțin viteza de oxidare a glucozei.

E. Cristea

1348. BENETATO GR., GABRIELESCU E., PARTENI L., BORDEIANU A. şi BOROŞ I., *Cercetări bio- şi histochimice privind proteinele nevraxiale în encefalomielita demielinizantă alergică experimentală.* Fiziol. norm. pat., 1961, *2*, 73—89.

S-au pus în evidenţă dereglări importante şi precoce ale metabolismului proteic şi ale stării fizico-chimice a proteinelor din ţesutul nervos. Aceste modificări preced pe cele ale metabolismului lipidic şi demielinizarea. Se emite ipoteza unui mecanism de auto-imunitate iniţiat şi menţinut de proteinele nervoase denaturate sub influenţa a diferiţi factori în encefalitele alergice.

E. Cristea

1349. RĂDULESCU P. şi DAVID R., *Cercetări asupra relaţiilor dintre novocaină şi activitatea colinesterazei serice.* Fiziol. norm. pat., 1961, *2*, 101—106.

S-au cercetat cu ajutorul metodei Zubkov-Pravdici-Neminski modificările activităţii colinesterazei din ser, în timp de 15 min după administrare intravenoasă de 0,1 g novocaină. Se constată o creştere a activităţii, care persistă timp de 30 min.

E. Cristea

1350. CUPARENCU B., GROSU L. şi DĂMĂCUŞ M., *Influenţa clorpromazinei asupra asimilării proteinelor plasmei despecificate, administrate parenteral.* Fiziol. norm. pat., 1961, *3*, 153—157.

Autorii au cercetat influenţa clorpromazinei asupra asimilării, în ficat şi splină, a proteinelor plasmatice despecificate, administrate parenteral la şobolani care fuseseră supuşi anterior unui regim sărac în proteine. În doze de 3 mg/kg de greutate corporală clorpromazina nu produce modificări în asimilarea proteinelor, atît în ficat cît şi în splină. În doze de 6 mg/kg de greutate corporală ea inhibă asimilarea proteinelor în ficat.

E. Cristea

1351. MAROS T., CSIKY N., FEJER L., KOVACS V., BLAŽSEK A. şi BELA K., *Factor stimulator al regenerării hepatice într-o mină de lignit.* Rev. igienă, 1961, *4*, 333—338.

Experienţe făcute pe 47 şobolani au arătat că administrarea orală a prafului de lignit (din mina Căpeni — Reg. Mureş - Autonomă maghiară) are ca efect atît intensificarea regenerării hepatice la animalele parţial hepatectomizate, cît şi protejarea parenchimului hepatic. Cercetarea cromatografică a extrasului de praf de lignit a permis evidenţierea mai multor substanţe organice reducătoare. Se presupune că factorii hepatoprotectori sînt acizii huminici de turbă, aflaţi totdeauna în zăcămintele de lignit.

A. Popescu

1352. SZABÓ S., DEZSI Z. şi VASS E., *Cercetări referitoare la acţiunea acidului silicic asupra glicemiei.* Rev. medico-chirurgic., Iaşi, 1961, **LXV**, *1*, 145—150.

Pe fondul injectării repetate timp îndelungat de soluţii de acid silicic, se produce o stare de hiperglicemie persistentă în urma administrării de glucoză. Resorbţia glucozei nu a fost influenţată de acidul silicic introdus în intestin. Glicoliza nu este influenţată de acidul silicic. Pe baza acestor date, autorii susţin că acidul silicic nu influenţează direct procesele enzimatice ale metabolismului glucidic; modificările acestuia, observate în silicoză, se datoresc în primul rînd tulburării mecanismelor nervoase şi hormonale ale glicoreglării.

A. Balcu

1353. TEODORU V., *Date noi în legătură cu sinteza grăsimii din lapte.* Probl. zoot. vet., 1962, *3*, 68—69.

Se prezintă rezultatele cercetărilor comunicate în ultimii doi ani în revistele sovietice, precum şi la Simpozionul de fiziologia şi biochimia lactaţiei de la Leningrad (iunie 1961).

H. Filipescu

1354. BORISENKO E. I., *Contribuţii la elaborarea procedeelor de selecţie a animalelor domestice, ţinînd seama de particularităţile lor constituţionale.* An. rom-sov., agr.-zoot., 1962, **XVI**, *1* (65), 111—121.

Producţia de lapte a vacilor creşte pe măsura creşterii indicelui volumului de sînge circulant, dar nu este influenţată de conţinutul de glutation. Conţinutul în fosfor lipoidic şi colesterină din sîngele găinilor mai tinere şi mai productive este mai mare decît la găinile bătrîne, ca şi conţinutul în vitaminele B_1 şi B_2 din gălbenuşul ouălor lor.

C. Săndulescu

X. BIOCHIMIE MEDICALĂ

1355. CÎRSTEA M. şi SUHACIU GH., *Rolul histaminei în producerea hipotensiunii anafilactice la cîine.* Studii şi cercet. fizol., 1961, **VI**, *4*, 639—649.

Histamina nu reprezintă factorul hipotensiv principal din şocul anafilactic şi peptonic la cîine.

H. D. Schell

1356. ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M. şi CIOBANU F., *Unele aspecte enzimatice legate de sindromul de citoliză hepatică.* Studii şi cercet. med. int., 1961, **II**, *6*, 763—771.

Referat general cu 45 indicaţii bibliografice.

C. Iordache

1357. MICU D., VELICAN C., GROZEA P., MIHĂILESCU E., MAXIMILIAN S. şi MATEESCU D., *Contribuţii la studiul citologic şi enzimocitochimic al ganglionului normal şi patologic. Nota V. Ganglionul limfogranulomului malign.* Studii şi cercet. med. int., 1961, **II**, *6*, 811—821.

S-a studiat pe 59 ganglioni de limfogranulom malign o serie de aspecte cito- şi enzimochimice. Dintre perturbările citoenzimochimice ce au apărut la nivelul lor, se subliniază cele puse în evidenţă prin determinarea fosfatazelor alcaline,acizilor ribonucleici şi dezoxiribonucleici, glicogenului şi lipidelor. Investigaţiile citoenzimochimice stabilesc diagnosticul de limfogranulom malign cu mai multă certitudine,în special în etapele în care aspectele sînt mai puţin caracteristice.

C. Iordache

1358. STEINBACH M., HARNAGEA P. şi LAZAROVICI M., *O probă de hiperlipemie provocată cu cortizon. Nota I. Răspunsul diferit la cortizon.* Studii şi cercet. med. int., 1961, **II**, *6*, 833—836.

S-a studiat hiperlipemia provocată de cortizon prin determinarea lipidelor totale, colesterolului, raportului beta-lipoproteine/alfa-lipoproteine în sînge. Se propune introducerea în practica explorărilor funcţionale ale metabolismului lipidic, a probei hiperlipemiei provocate prin cortizon, deoarece prin această probă se pot pune mai bine în evidenţă tulburările din metabolismul lipidelor.

C. Iordache

1359. VELICAN C., CIOBANU C., MIHĂILESCU E. şi ŞUŢIANU ST., *Cercetări de cito- şi histochimie în limfadenopatia din poliartrita cronică evolutivă.* Studii şi cercet. med. int., 1962, **III**, *1*, 69—76.

S-a constatat din punct de vedere citochimic creşterea cantitativă intracelulară a mucopolizaharidelor, a acizilor ribonucleici şi a proteinelor PAS-pozitive şi Millon-pozitive, care indică o activare a sintezei anumitor substanţe de tip protidic, a glicogenului, a acidului hialuronic, a scleroproteinelor birefringente, a colesterolului, a acizilor graşi, a acetalfosfatidelor şi a lipoproteinelor. Din punct de vedere histochimic s-a constatat acumularea mucopolizaharidelor neutre şi uneori a scleroproteinelor birefringente.

C. Iordache

1360. ERNEST I., BONA C. şi COTARCEA P., *Studii privind aspectul aminoacizilor liberi din mieloleucoze.* Studii şi cercet. med. int., 1962, **III**, *1*, 113—118.

S-au determinat cromatografic aminoacizii liberi plasmatici la 42 bolnavi de mieloleucoză acută şi cronică, S-a constatat dispariţia aproape completă a aminoacizilor (cu excepţia acidului glutamic, glicocolului şi glutaminei) în mieloleucoza acută. În formele cronice s-a constatat o creştere a acidului glutamic şi a glicocolului şi apariţia în plus a histidinei. În formele tratate apare în plus cistina, lizina şi ornitina.

C. Iordache

1361. STRAT C., MARDARE G. şi POPESCU N., *Valoarea unor teste enzimologice în diagnosticul şi prognosticul hepatopatiilor.* Studii şi cercet. med., Iaşi, 1960, **XI**, *2*, 407—412.

Se cercetează activitatea transaminazei glutamice, oxalacetice, aldolazei şi fosfatazelor, punînd-o în paralel cu cercetarea proteinemiei şi testelor de disproteinemie — timol şi Gross, în cazurile de hepatită epidemică, hepatită cronică, ciroză şi icter mecanic. În hepatita epidemică, ca şi în icterele mecanice cu mari alteraţii celulare, activitatea transaminazelor şi aldolazei este constant crescută, spre deosebire de hepatita cronică şi ciroză, în care activitatea transaminazelor este crescută, pe cînd a aldolazei este în limite normale ; fosfatazele sînt foarte crescute numai în icterele mecanice. În hepatita epidemică, în ciroza decompensată şi în icterul mecanic cu alterarea parenchimului există o concordanţă(ce dispare în hepatitele cronice şi sechelele de hepatită epidemică) a valorilor transaminazei cu testele de disproteinemie.

A. Batcu

1362. BATCU A., *Cercetarea funcţiei fosforilante a ficatului prin proba cu miere de albine.* Studii şi cercet. med., Iaşi, 1960, **XI**, *2*, 555—571.

Funcţia fosforilantă a ficatului este cercetată prin determinarea, înainte şi la 2, 4, 8 şi 24 de ore după administrarea mierii de albine, a raporturilor urinare : aciditate de titrare/aciditate neutralizată de amoniac, aciditate totală/uree, aciditate totală/aciditate fosforică, azot formol/azot hipobromit şi determinarea în sînge a glucozei şi fosforului mineral înainte şi timp de 2 ore la 30 min după administrarea mierii. În insuficienţa hepatică fosforemia rămîne neschimbată după ingerarea mierii, spre deosebire de cazurile normale, unde ea scade ca urmare a folosirii fosfaţilor în timpul metabolizării fosfaţilor. Raportul aciditate fosforică/uree creşte în loc să scadă, pentru a compensa acidoza, eliminînd o cantitate mare de acid fosforic. Creşterea acestui raport la 4 ore după administrarea mierii indică un grad de insuficienţă pancreatică insulară, care însoţeşte uneori insuficienţa hepatică.

A. Batcu

1363. RĂȘCANU V., ROTARU C., DOROGAN D., SOLOMON C. și KAPRI M., *Relații de ansamblu privind modificările funcționale ale organismului uman în efort și oboseală*. Studii și cercet. med., Iași, 1961, **XII**, *1*, 53—70.

În cursul efortului și oboselii la om, cantitatea lucrului efectuat, metabolismul energetic și fracțiunile seroproteice variază în raport cu stările de antrenament. La subiecții neantrenați, deși coeficientul de acțiune utilă (randamentul) este mai scăzut, nevoia de oxigen, durata de restituire și cheltuielile de energie în calorii pe minut sînt mai crescute. Modificările în componenta proteică sînt de asemenea mai accentuate la persoanele neantrenate în munca fizică.

A. Balcu

1364. NIȚESCU I. I., CONSTANTINESCU A. și MIHĂIȚĂ M., *Electroforeza pe hîrtie în efortul fizic*. Fiziol. norm. pat., 1961, *2*, 93—94.

S-au determinat electroforetic variațiile procentuale ale fracțiunilor proteice din ser la subiecții neantrenați, după efectuarea unui travaliu mecanic de 42 000 kg m. S-a găsit o creștere a γ- și β-globulinelor și a α_2-glucoproteinelor; lipoproteinograma a prezentat aspectul normal.

E. Cristea

1365. STRAT C., RUSSU G., CREȚEANU G., POPESCU N., DRĂGAN M., LUNGU I. și MARDARE G., *Variațiile aldolazei serice în hepatopatii și unele afecțiuni de sistem*. Rev. medico-chirurgic., Iași, 1961, **LXV**, *1*, 47—52.

Aldolaza serică apare electiv crescută în hepatita acută, mai ales la început, și poate servi ca test de diagnostic pentru hepatita virotică anicterică. În bolile de sistem testul aldolazei este puțin precis.

A. Balcu

1366. GAVRILESCU G. și CĂLIN G., *Studiu comparativ între dozările steroizilor sexuali și frotiul citohormonal vaginal în diagnosticul avortului endocrin*. Rev. medico-chirurgic., Iași, 1961, **LXV**, *1*, 101—106.

Frotiul citohormonal vaginal concordă cu rezultatul dozărilor de steroizi sexuali în 40% cazuri. Cea mai mare concordanță a fost găsită în cazurile de insuficiență progestativă. În insuficiența globală și în hiperandrogenie frotiul nu este concludent, manifestîndu-se ca și în cazul unei sarcini cu evoluție normală.

A. Balcu

1367. BATCU A., *Contribuții la studiul modificărilor biochimice în hepatita epidemică. (Privire de ansamblu.)* Rev. medico-chirurgic., Iași, 1961, **LXV**, *1*, 159—164.

Se pun în evidență perturbările precoce ale metabolismului hepatic care apar în hepatită și importanța pe care o are readucerea la normal a rezervei alcaline, clorului, sodiului, glicemiei, fosfaților și proteinelor serice. Se insistă asupra importanței testului de imperfecțiune ureogenică și a cistinuriei. Fosforilările sînt foarte deficiente și se pune în evidență dependența acestei stări și de o stare de insuficiență pancreatică.

A. Batcu

1368. BĂRBUȚĂ R., HURMUZACHE E., TEODORESCU E., TUDORANU A. și APOSTOL S., *Contribuții la studiul diabetului fosfaturic.* Rev. medico-chirurgic., Iași, 1961, **LXV** *3*, 611—615.

Autorii atribuie diabetului fosfaturic originea rahitismului grav vitamino-rezistent.

A. Batcu

1369. BUȘILĂ T. V. și GHIMICESCU G., *Influența cianurii de mercur asupra cationemiei în tifosul exantematic.* Rev. medico-chirurgic., Iași, 1961, **LXV**, *3*, 677—680.

Administrarea de cianură de mercur în tifosul exantematic normalizează natremia și calcemia și crește magneziul în sînge; potasemia nu este influențată. Crește rezerva alcalină, scade azotemia și se normalizează clorul globular. Cianura de mercur nu acționează însă prin aceleași mecanisme ca diureticile mercuriale.

A. Batcu

1370. VANCEA P., BATCU A., VANCEA P. P. și BATCU V., *Asupra valorii colesterolemiei și glicemiei la bolnavii de cataractă înainte și după operație.* Rev. medico-chirurgic., Iași, 1961, **LXV**, *4*, 871—874.

La 4/5 din bolnavii de cataractă senilă se constată hipercolesterolemie, care scade după 12 zile de la operație. Glicemia este mai puțin modificată.

A. Batcu

1371. ANGHELESCU V., TÎRNOVEANU G., RĂILEANU I., TÎLMACIU A. şi MITESCU G., *Aspecte clinice, biochimice şi morfopatologice în distrofiile musculare progresive familiale la copii.* Rev. medico-chirurgic., Iaşi, 1961, **LXV**, *4*, 939—946.

Pe şapte cazuri cercetate, autorii găsesc perturbări mari ale metabolismelor glucidic, lipidic şi proteic. S-a cercetat proteino-, lipido- şi glucidograma, calcemia, teste de disproteinemie, aminoaciduria, creatina şi creatinina, aldolaza şi colesterolul.

A. Balcu

1372. KEREKES M. şi KOVÁCS E., *Contribuţiuni la problema corelaţiei dintre reacţia lui Mallén şi fracţiunile proteice din ser.* Rev. medic., Tg. Mureş, 1961, **VII**, *1*, 44—47.

Pe cale electroforetică autorii arată că în reacţiile Mallén pozitive γ-globulinele sînt crescute în 71% din cazuri, indiferent de maladia care a provocat această reacţie. Iodul utilizat în reacţie se fixează pe această fracţiune, ea fiind practic înlăturată prin precipitarea ce are loc la reacţia Mallén. În multe cazuri însă, în care γ-globulinele erau crescute, reacţia Mallén a fost negativă sau numai slab pozitivă. În toate aceste cazuri s-a găsit şi o creştere considerabilă de β-globuline, care se consideră de către autori a avea o acţiune antagonistă faţă de γ-globuline în această reacţie. S-au constatat şi cazuri în care reacţia este pozitivată de α-globulinemii crescute.

D. Moţel-Grigoraş

1373. HIRSCHFELD I., KOVÁCS E. şi SZABÓ I., *Studiul comportării procesului de proteoliză cateptică şi triptică a proteinelor serului sangvin în hepatita epidemică.* Rev. medic., Tg. Mureş, 1961, **VII**, *2*, 178—180.

Se studiază proteoliza cateptică şi triptică la serurile dializate şi nedializate ale bolnavilor şi se interpretează rezultatele pe baza unor date anterioare, în lumina cărora în ser ar exista substanţe de natură organică cu greutate moleculară mică, avînd o acţiune inhibitoare, şi ioni anorganici avînd o acţiune activatoare asupra proteolizei cateptice. În cazul leziunilor hepatice grave raportul inhibitor-activator s-ar schimba în sensul creşterii acţiunii activatorului. Cercetînd în mod similar proteoliza triptică, autorii constată că proteoliza scade la serurile bolnavilor de hepatită epidemică şi că diferenţa dintre proteoliza seroproteinelor dializate şi nedializate este inferioară celei găsite în cazul altor boli. Se elaborează o ipoteză de lucru după care în patologie ar avea un rol de bază modificarea activatorilor şi inhibitorilor enzimatici din organism.

D. Moţel-Grigoraş

1374. KEMÉNY GY., FESZT T. şi RÓNA L., *Cercetări în legătură cu fosfataza tisulară alcalină în ficatul bolnavilor cu icter mecanic şi colecistopatie.* Rev. medic., Tg. Mureş, 1961, **VII**, *2*, 180—182.

S-a examinat activitatea fosfatazică tisulară a ficatului la bolnavi suferind de icter mecanic şi colecistopatii cronice. În icterul mecanic, activitatea fosfatazei alcaline se intensifică în capilarele biliare chiar în primele zile de stază biliară, în substanţa intercelulară a ţesutului conjunctiv periportal. Enzima apare în a 8—9-a zi de stază, iar în celulele hepatice abia după 4—5 săptămîni, probabil ca semn al leziunii celulelor hepatice. În colecistopatii cronice, în 50% din cazuri nu s-a găsit o activitate a fosfatazei alcaline care să poată fi considerată patologică, dar nu s-au găsit modificări nici cu ajutorul procedeelor histopatologice de uz curent. În celelalte cazuri, indicînd prezenţa unei hepatite cronice, s-a pus în evidenţă o activitate fosfatazică în substanţa intercelulară a spaţiului periportal. În cazuri mai grave, fosfataza alcalină apare şi în celulele hepatice.

D. Moţet-Grigoraş

XI. BIOCHIMIA NUTRIŢIEI

XII. BIOCHIMIE TEHNICĂ

XIII. FARMACOLOGIE. TOXICOLOGIE

1375. OERIU S., OERIU I. şi CRĂCEA M., *Relaţii între structura chimică şi activitatea tuberculostatică a derivaţilor de tiouree şi tion-uretani. Nota IV.* Studii şi cercet. chim., 1961, **IX**, *2*, 307—315.

Autorii au studiat relaţiile între structura chimică şi activitatea tuberculostatică la o serie de derivaţi de tiouree. Dintre tion-uretanii sintetizaţi, cei mai activi sînt cei de tipul $R.O.C_6.H_4.NH.CS.OR'$ în care R şi R' au 3, 4 şi 5 atomi de carbon. Se dau metodele de sinteză a tion-uretanilor.

M. Mănescu

1376. OERIU I., *Relaţii între structura chimică şi acţiunea antituberculoasă în clasa derivaţilor alfa-naftochinonei substituiţi în poziţiile 2, 3. Nota I.* Studii şi cercet. chim., 1961, **IX**, *2*, 315—331.

Autorul a sintetizat 112 derivaţi de alfa-naftochinonă substituiţi cu amine în poziţia 2, în poziţia 3 fiind H, CH_3, Cl sau Br. Din aceştia 59 nu sînt descrişi în literatură şi pentru ei se indică metoda de preparare şi constantele fizice. Sînt date valorile bacteriostatice faţă de *Mycobacterium tuberculosis H. Ratti* pe mediu Sauton ale fiecărui derivat în parte.

M. Mănescu

1377. OERIU I., *Relații între structura chimică și acțiunea antituberculoasă în clasa derivaților de alfa-naftochinonă substituiți în pozițiile 2,3. Nota II.* Studii și cercet. chim., 1961, **IX**, *2*, 331—343.

Autorul a sintetizat 88 derivați de alfa-naftochinonă substituiți în pozițiile 2 sau 2 și 3 cu SH, CH_3, Cl sau Br. Pentru 57 dintre ei, care nu sînt descriși în literatură, se indică metoda de preparare și constantele fizice. Activitatea bacteriostatică a acestor derivați este determinată față de *Mycobacterium tuberculosis H. Ratti* pe mediu Sauton.

M. Mănescu

1378. PÎSLARU V., GALERIU R și PASCU L., *Influența unor factori de mediu asupra toxicității benzenului și monoclorbenzenului.* Rev. igienă, 1961, *4*, 313—318.

S-au provocat intoxicații la șoareci prin expunerea animalelor în camera Pravdin la benzen (30 mg/l) și monoclorbenzen (11,5 mg/l) și s-a cercetat influența exercitată asupra toxicității de următorii factori: temperatura ridicată (40°C), alimentarea prealabilă, administrarea de alcool etilic și ionizarea prealabilă. S-a constatat că toxicitatea crește prin expunere la temperatură ridicată sau administrare de alcool etilic și scade după ionizare sau alimentare.

A. Popescu

1379. VERDEȘ N., *Modul de acțiune al sărurilor organice de mercur în tratamentul trihomonozei.* Probl. zoot. vet., 1961, *12*, 50—53.

Sărurile organice de mercur acționează asupra flagelatului *Trihomonas genitalis bovis* prin blocarea grupărilor sulfhidril ale enzimelor, ceea ce provoacă perturbarea metabolismului glucidic și moartea parazitului.

H. Filipescu

ŞEDINŢELE CERCULUI DE BIOCHIMIE GENERALĂ ŞI APLICATĂ AL INSTITUTULUI DE BIOCHIMIE AL ACADEMIEI R.P.R. ŞI CATEDREI DE BIOCHIMIE DE LA UNIVERSITATEA DIN BUCUREŞTI

În ziua de 26 aprilie 1962 a avut loc la Institutul de biochimie şedinţa prezidată de prof. L. M. Buruiană, cu următoarea ordine de zi :

1. G. Strungaru (Facultatea de ştiinţe naturale) : *Mecanismul transmiterii sinaptice.*

Datorită folosirii unor microtehnici moderne, s-a adunat un bogat material faptic cu privire la problema transmiterii sinaptice. J. C. Eccles propune următoarea clasificare a tipurilor de sinapse : sinapse excitatorii cu tip de transmitere chimic şi cu tip de transmitere electric ; sinapse inhibitorii cu tip de transmitere chimic şi cu tip de transmitere electric.

În categoria sinapselor excitatorii cu tip de transmitere chimic se încadrează în primul rînd o serie de sinapse al căror mediator chimic este acetilcolina, ca şi numeroase alte sinapse care au ca mediator simpatina sau al căror mediator încă nu este cunoscut. Microscopul electronic evidenţiază o remarcabilă uniformitate structurală a sinapselor cu mediaţie acetilcolinică. Se remarcă în terminaţiile presinaptice un întreg spectru de transformări ale mitocondriilor în vezicule cu un diametru de 300—500 Å, despre care se crede că ar fi încărcate cu acetilcolină, şi se observă un spaţiu intrasinaptic cu o lărgime de 200—300 Å. În esenţă , mecanismul transmiterii la aceste sinapse ar consta în eliberarea de acetilcolină din vezicule în spaţiul intrasinaptic, sub acţiunea impulsurilor nervoase în terminaţiile presinaptice. Acetilcolina acţionează astfel asupra membranei postsinaptice determinînd modificările de permeabilitate ionică ale acesteia, care duc la apariţia fenomenelor electrice ce pot genera potenţiale de acţiune. La nivelul suprafeţei externe a membranei postsinaptice, acetilcolina este inactivată de colinesterază. Spaţiul intrasinaptic previne interacţiunea electrică dintre elementele pre- şi postsinaptice.

Spaţiul intrasinaptic mai mic (150 Å) observat la sinapsele excitatorii cu tip de transmitere electrică, funcţionează ca un redresor, asigurînd cuplajul electric între elementele pre- şi postsinaptice. Datorită acestui cuplaj sinapsele de tip electric funcţionează virtual fără latenţă.

În ultima vreme, s-a stabilit că inhibiţia în sistemul nervos central este un proces fiziologic specific, diferit de excitaţie şi nu o consecinţă a procesului de excitaţie, desfă-

şurîndu-se pe căi speciale, diferite de căile excitatorii. La nivelul sinapselor inhibitorii de tip chimic se eliberează un mediator care determină în membrana subsinaptică fenomene ionice hiperpolarizante, care se opun acţiunii excitatorii depolarizante. La nivelul sinapselor inhibitorii de tip electric se realizează o hiperpolarizare pasivă a membranei postsinaptice, de tipul celei produse de un curent anodic. Natura mediatorului chimic inhibitor este încă necunoscută, se discută probabilitatea identificării sale cu acidul γ-aminobutiric.

2. L. Arnet (Institutul de biochimie): *Inhibarea prin uree a peroxidazei din frunzele de porumb şi efectul protector al ionilor de cupru.*
Lucrarea s-a publicat în nr. 1 din 1962 al revistei.

ŞEDINŢELE CERCULUI DE BIOCHIMIE MEDICALĂ AL INSTITUTULUI DE BIOCHIMIE AL ACADEMIEI R.P.R. ŞI SOCIETĂŢII ŞTIINŢELOR MEDICALE — FILIALA BUCUREŞTI

În ziua de 3 aprilie 1962 a avut loc la Societatea ştiinţelor medicale şedinţa prezidată de prof. dr. Al. Ionescu-Matiu, cu următoarea ordine de zi:

1. M. Furnică (Institutul oncologic): *Peroxizii lipidici şi rolul lor în radiobiologie.*
Pentru elucidarea mecanismului tulburărilor metabolice ce se produc în organismul animal în cursul bolii actinice, prezintă un interes indiscutabil studiul apariţiei şi acumulării peroxizilor lipidici în diverse ţesuturi şi influenţa pe care ei o exercită asupra diferitelor procese biochimice. Peroxizii lipidici iau naştere în ţesuturi prin acţiunea oxidantă exercitată de radicalii radiolitici formaţi în apa iradiată. Formarea peroxizilor lipidici în ţesuturile normale este catalizată de acidul ascorbic, compuşii cu hem (în special citocromii) şi ionul de fier. O serie de substanţe cum sînt alfa-tocoferolul, EDTA, vitamina A, menadiona, vitamina K_1, ubichinona, carotenul, fosfatidele şi unii antioxidanţi sintetici (hidrochinona, acidul galic şi derivaţii lui, butiloxianisolul) inhibă formarea peroxizilor lipidici.
În urma iradierii în ţesuturi se formează peroxizi care exercită o acţiune toxică asupra metabolismului, manifestată prin distrugerea grupărilor — SH ale proteinelor, inhibiţie enzimatică, inhibiţia fosforilării oxidative, inhibiţia mitozei. Injectînd la animale normale cantităţi de peroxizi egale cu cele formate în urma acţiunii radiaţiilor, apar fenomene toxice asemănătoare cu cele produse în boala de iradiere.
La animalele iradiate sub protecţie, cantitatea de peroxizi formată în ţesuturi este mai mică decît la animalele iradiate fără substanţă protectoare.

2. M. Furnică şi M. Spiridon (Institutul oncologic): *Viteza de peroxidare a omogenatelor de ţesuturi la iradierea* in vitro.
Lucrarea se publică în numărul de faţă al revistei.

3. O. Costăchel, N. Voiculeţ, I. Pop şi I. Corneci (Institutul oncologic): *Studiul activităţii eritropoetice cu ^{59}Fe la cîini normali şi iradiaţi cu doze letale.*
S-a urmărit activitatea eritropoetică la animale tratate cu doze letale de radiaţii X sub protecţie de ţesut hematopoetic autolog. S-a determinat pool-ul Fe plasmatic,

viteza de reînnoire a Fe plasmatic, viteza de reînnoire a Fe în hematii, reînnoirea Fe zilnic, sideremia, la intervale de 4, 6 și 12 luni de la iradiere, comparativ cu loturile de control. Se observă la aceste intervale de timp o viteză de reînnoire a Fe în hematii mai lentă, însă în creștere spre limitele normale, ceea ce indică persistența leziunii la nivelul funcției hematoformatoare. Investigațiile cu ^{59}Fe oferă posibilitatea de a observa intensitatea leziunii funcționale și revenirea la activitatea normală a eritropoezei prin determinarea coeficienților dinamici ai metabolismului intermediar ai Fe.

4. E. Cristea și C. Gurban (Catedra de biochimie I. M. F.): *Aspecte noi ale fosforilării oxidative cu succinat în mitocondriile din ficat de șobolan.*

Materialul formează obiectul a două lucrări care se publică în numărul de față al revistei.

În ziua de 24 aprilie 1962 a avut loc la Societatea științelor medicale ședința prezidată de prof. L. M. Buruiană, cu următoarea ordine de zi:

1. S. Oeriu, M. Tigheciu-Dumitrescu și L. Enache-Perederi (Catedra de biochimie I.M.F.): *Studiul activității unor enzime de oxido-reducere în procesele de îmbătrînire.*
Lucrarea se publică în numărul de față al revistei.

2. S. Oeriu, G. Grigorescu și M. Mănescu (Catedra de biochimie I.M.F.): *Dinamica fosforului lipidic în funcție de vîrsta animalului și sub acțiunea unor substanțe proprii organismului.*
Lucrarea se publică în numărul de față al revistei.

3. S. Oeriu, G. Costescu, O. Teodorescu și I. Șoimu (Catedra de biochimie I.M.F.): *Studiul activității cocarboxilazei, transaminazei și al capacității de transacetilare în procesele de îmbătrînire.*
Lucrarea se publică în numărul de față al revistei.

4. S. Oeriu, I. Tănase și V. Dinu (Catedra de biochimie I.M.F.): *Studiul aminoacidemiei în tuberculoza experimentală la cobai.*
Lucrarea se publică în numărul de față al revistei.

5. P. Georgescu, I. Popescu și E. Păunescu (Institutul de ftiziologie): *Modificările lipidelor sangvine în tuberculoza gravă.*

Cercetîndu-se la 18 bolnavi proteinuria, proteinograma serului, lipidele serice totale, colesterolul total, esterificat și liber și proba cu roșu de Congo, s-a constatat că tuberculoza pulmonară fibrocavitară hipercronică, complicată cu amiloidoza renală, se însoțește rareori de o creștere absolută a lipidelor serice totale. În schimb, spre deosebire de tuberculoza pulmonară neasociată, unde colesterolul total și esterificat sînt scăzute proporțional cu hipercronicitatea bolii, în cazurile studiate colesterolul total este moderat crescut (2,26 – 3,70 $g^0/_{00}$), la peste 60% dintre indivizi. Colesterolul esterificat și liber crește concomitent cu colesterolul total, creșterea fiind mai puțin accentuată în cazul colesterolului esterificat. Aceasta face ca raportul dintre colesterolul esterificat

și cel total să fie scăzut la majoritatea bolnavilor (81 % din cazuri). Scăderea acestui raport indică o tulburare a funcției hepatice de esterificare a colesterolului, datorită intoxicării cronice tuberculoase a ficatului, influențelor interoceptive rinichi-ficat și localizării hepatice a amiloidozei secundare difuze, în cazul tuberculozei pulmonare cronice. În sfîrșit, tuberculoza pulmonară fibrocavitară cronică completată cu aminoidoza renală este însoțită și de o scădere accentuată a albuminei serice și o creștere compensatoare a serum-globulinelor, în cadrul unei proteinemii în limite normale. În concluzie, amiloidoza renală, complicînd tuberculoza gravă, se însoțește de hipercolesterolemie moderată și lipemie normală, ceea ce poate contribui la diferențierea acesteia de nefroza lipoidică. În cazul existenței unei hiperlipemii și hipercolesterolemii în cadrul amiloidozei renale, este de presupus asocierea nefrozei amiloide cu nefroza lipoidică.

MŰSZAKI KÖNYVTÁRES DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT

23

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI R.P.R.

ILIE VASILESCU, **Enzimele**, 429, p., 22,80 lei.

T. NĂŞCUŢIU, **Cromatografia pe hîrtie a substanţelor anorganice**, 220 p. + 3 pl., 13,90 lei.

J. REICHEL, **Tehnologia coloranţilor antrachinonici**, 440 p. + 3 pl., 21, 50 lei.

Pentru a vă asigura o colecţie completă şi primirea la timp a revistei, reînnoiţi abonamentul dv. pentru anul 1963.

ABONAMENTELE SE FAC LA OFICIILE POŞTALE, AGENŢIILE POŞTALE, FACTORII POŞTALI ŞI DIFUZORII VOLUNTARI DIN ÎNTREPRINDERI ŞI INSTITUŢII

Din

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

au apărut:

anul I, 1958, 4 n-re (a 5 lei);
anul II, 1959, 4 n-re (a 5 lei);
anul III, 1960, 4 n-re (a 5 lei);
anul IV, 1961, 4 n-re (a 5 lei);
anul V, 1962, 2 n-re (a 7 lei).

Numerele curente se găsesc de vînzare la

LIBRĂRIA ACADEMIEI R.P.R.

Bucureşti, Calea Victoriei nr. 27, sau la orice librărie ştiinţifică din ţară.

Se pot comanda şi prin poştă la secţia „Cartea prin poştă" de pe lîngă Librăria Academiei R.P.R., sau la librăria

„CARTEA PRIN POSTĂ"

Bucureşti, str. Biserica Enei nr. 16, raionul 30 Decembrie.

Abonamentele se fac la oficiile poştale, prin factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Pentru străinătate, cererile de numere izolate sau de abonamente se fac prin întreprinderea de stat pentru comerţul exterior „Cartimex" I.S.C.E., str. Aristide Briand nr. 14, sau căsuţa poştală 134—135, Bucureşti.

I. P. 2, c. 3104

Lei 7.—

F 1330

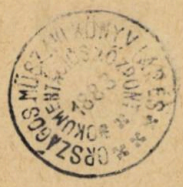
ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

4
ANUL V
1962

studii şi cercetări de biochimie

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE



STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

4

ANUL V

1962

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

COMITETUL DE REDACŢIE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI, *redactor responsabil*; ACADEMICIAN R. VLĂDESCU; D. ISĂCESCU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; S. OERIU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; E. SORU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; M. MEZINCESCU; H. SLUŞANSCHI, *redactor adjunct*; I. VASILESCU; V. ALEXANDRESCU, *secretar tehnic de redacţie.*

REVISTA STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

APARE DE 4 ORI PE AN

Redacţia: BUCUREŞTI, Str. Popovici nr. 20
Tel. 18.43.55 — 17.79.63

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul V, nr. 4 1962

SUMAR

Pag.

EUGEN MACOVSCHI, TRAIAN RĂDULESCU şi LORA SCOLNIC, Exosmoza fosforului anorganic ca test al stării muşchiului. Notă preliminară 485

EUGENIA SORU şi FLORICA IONESCU-STOIAN, Purificarea hialuronat liazei prin cromatografie pe DEAE-Sephadex 497

L. M. BURUIANĂ, EL. HADARAG şi V. PAVLU, Cercetări cu privire la proteinele din plasma seminală 507

L. M. BURUIANĂ şi V. PAVLU, Efectul radiaţiilor gamma (^{60}Co) asupra catalazei 517

M. D. MEZINCESCU, A. POPESCU-ŞTEFĂNESCU, E. CRISTEA şi I. DINU, Metodă pentru studiul variaţiilor contingente ale nevoii de azot 527

VICTOR GHEŢIE şi LUCIA BUZILĂ, Cercetări imunochimice asupra germinaţiei la bob (*Vicia faba*) 541

I. BRAD, IULIA LÁSZLÓ, GH. VALUŢĂ şi CLEMENŢA MICLEA, Influenţa transplantării embrionului de orz pe endospermul de secară asupra unor procese biochimice la hibrizi, în corelaţie cu rezistenţa la ger 551

I. F. DUMITRU, Biochimia creierului. II. Studii asupra cantităţii şi vitezei de refacere a lipidelor totale din creier 561

I. F. DUMITRU, Biochimia creierului. III. Studiul vitezei de refacere a fosfolipidelor totale şi principalilor componenţi fosfolipidici din creier cu ajutorul carbonului radioactiv ^{14}C 573

EUG. PĂUNESCU, Corelaţii între structura chimică, potenţialul oxidoreducător şi activitatea tuberculostatică a unor chimioterapice (etioniamida, hidrazida I. N., tiosemicarbazona, acidul ascorbic) 587

NOTĂ DE LABORATOR

P. GEORGESCU şi ELENA CONSTANTINESCU, Micrometodă pentru dozarea colesterolului total, esterificat şi liber 595

RECENZII 601

CRONICA BIOCHIMIEI DIN R.P.R. 627

INDEX ALFABETIC 629

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOCHIMIE

ÉTUDES ET RECHERCHES DE BIOCHIMIE

Tome V, n° 4 1962

SOMMAIRE

Page

EUGEN MACOVSCHI, TRAIAN RĂDULESCU et LORA SCOLNIC, L'exosmose du phosphore inorganique comme test de l'état du muscle. Note préliminaire 485

EUGENIA SORU et FLORICA IONESCU-STOIAN, Purification de l'hyaluronate-lyase par chromatographie sur DEAE-Séphadex 497

L. M. BURUIANĂ, EL. HADARAG et V. PAVLU, Recherches sur les protéines du plasma séminal 507

L. M. BURUIANĂ et V. PAVLU, Effet des radiations gamma (^{60}Co) sur la catalase 517

M. D. MEZINCESCU, A. POPESCU-ŞTEFĂNESCU, E. CRISTEA et I. DINU, Méthode pour l'étude des variations contingentes du besoin en azote . 527

VICTOR GHEŢIE et LUCIA BUZILĂ, Recherches immunochimiques sur la germination de la fève (*Vicia faba*) 541

I. BRAD, IULIA LÁSZLÓ, GH. VALUŢĂ et CLEMENŢA MICLEA, Influence que la transplantation de l'embryon d'orge sur l'endosperme de seigle exerce sur quelques processus biochimiques des hybrides en corrélation avec la résistance au gel 551

I. F. DUMITRU, Biochemistry of brain. II. Studies on the quantity and the rate of recovering the total lipidic fraction of brain 561

I. F. DUMITRU, Biochemistry of brain. III. A study on the rate of recovering the total phospholipids and of the main phospholipidic constituents of brain, by means of radioactive carbon, ^{14}C 573

EUG. PĂUNESCU, Corrélations entre la structure chimique, le potentiel oxydo-réducteur et l'activité tuberculostatique de quelques substances chimio-thérapeutiques (éthionamide, hydrazide I. N., thiosemicarbazone, acide ascorbique) 587

NOTE DE LABORATOIRE . . . . . .

P. GEORGESCU et ELENA CONSTANTINESCU, Microméthode pour le dosage du cholestérol total, estérifié et libre 595

COMPTES RENDUS 601

CHRONIQUE DE LA BIOCHIMIE DANS LA R.P. ROUMAINE . . 627

INDEX ALPHABÉTIQUE 637

ÉDITIONS DE L'ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE

АКАДЕМИЯ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

ТРУДЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ ПО БИОХИМИИ

Том V, № 4 1962

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

ЕУДЖЕН МАКОВСКИЙ, ТРАЯН РЭДУЛЕСКУ и ЛОРА СКОЛЬНИК, Эксосмос неорганического фосфора как показатель состояния мышцы. Предварительное сообщение 485

ЕУДЖЕНИЯ СОРУ и ФЛОРИКА ИОНЕСКУ-СТОЯН, Очистка гиалуронат-лиазы путем хроматографирования на DEAE-Sephades 497

Л. М. БУРУЯНЭ, ЕЛ. ХАДАРАГ и В. ПАВЛУ, Исследования белков семенной плазмы 507

Л. БУРУЯНЭ и В. ПАВЛУ, Эффект, оказываемый гамма-излучениями (^{60}Co) на каталазу 517

М. Д. МЕЗИНЧЕСКУ, А. ПОПЕСКУ-ШТЕФЭНЕСКУ, Е. КРИСТЯ и И. ДИНУ, Метод исследования случайных изменений потребности в азоте 527

ВИКТОР ГЕЦИЕ и ЛУЧИЯ БУЗИЛЭ, Иммунохимические исследования прорастания у бобов (*Vicia faba*) 541

И. БРАД, ЮЛИЯ ЛАСЛО, Г. ВАЛУЦЭ, КЛЕМЕНЦА МИКЛЯ, Влияние пересадки зародыша ячменя на эндосперм ржи на некоторые биохимические процессы у гибридов в связи с морозостойкостью 551

И. Ф. ДУМИТРИУ, Биохимия мозга. II. Исследование количества фракции общих липидов мозга и скорости их восстановления 561

И. Ф. ДУМИТРУ, Биохимия мозга. III. Изучение скорости восстановления общего содержания фосфолипидов и главных фосфолипидных составляющих мозга при помощи радиоактивного углерода ^{14}C 573

Е. ПЭУНЕСКУ, Соотношения между химическим строением, окислительно-восстановительным потенциалом и туберкулостатической активностью некоторых химиотерапевтических веществ (этионамид, ГИК, тиосемикарбазон, аскорбиновая кислота) 587

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАМЕТКИ

П. ДЖЕОРДЖЕСКУ и ЕЛЕНА КОНСТАНТИНЕСКУ, Микрометод для определения общего, этерифицированного и свободного холестерола 595

РЕЦЕНЗИИ 601

ХРОНИКА БИОХИМИИ В РНР 627

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ 633

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ

EXOSMOZA FOSFORULUI ANORGANIC CA TEST AL STĂRII MUȘCHIULUI

NOTĂ PRELIMINARĂ

DE

ACADEMICIAN EUGEN MACOVSCHI, TRAIAN RĂDULESCU și LORA SCOLNIC

Comportarea compușilor organici ai acidului fosforic și în special a fosfagenului și a acizilor adenozinfosforici în cadrul biochimismului muscular a format obiectul numeroaselor lucrări efectuate de diferiți cercetători. Examinînd aceste lucrări, L. Jendrassik și I. Faiszt [1] au constatat că unele dintre ele cuprind rezultate contradictorii și chiar mai mult : uneori unul și același cercetător se contrazice în diferitele lucrări, revenind asupra concluziilor sale anterioare. După părerea lor, contradicțiile semnalate se datoresc imperfecțiunii metodelor de investigație și în special procedeului de răcire bruscă și puternică a mușchilor (de exemplu prin azot lichid), folosit atît de curent în tehnica cercetării biochimismului muscular.

Se pare însă că, în afara deficiențelor semnalate de L. Jendrassik și I. Faiszt, apariția rezultatelor contradictorii poate fi datorită și altor cauze. Așa de exemplu, examinarea lucrărilor diferiților cercetători, făcută cu prilejul investigațiilor asupra comportării fosfagenului în diferite stări de activitate și excitabilitate a mușchilor [2], [3], ne-a arătat că fiecare autor folosește excitația electrică în condiții care rareori se potrivesc cu acelea folosite de alți autori. Or, dat fiind că efectul curentului electric asupra biochimismului muscular poate să depindă de intensitatea curentului, diferența de potențial, frecvența, durata de acțiune, modul de aplicare etc., înseamnă că curenții electrici diferiți din punctul de vedere al caracteristicilor lor, chiar dacă provoacă la mușchi aceleași răspunsuri de contracție, identice ca intensitate (mărime), forță și posibilitate de repetiție, pot duce totuși la rezultate diferite din punct de vedere biochimic.

Într-adevăr, curenții relativ slabi, în sensul că diferitele lor caracteristici și durata de acțiune nu depășesc anumite limite, specifice fie-

cărei categorii de muşchi, excită muşchiul şi provoacă contracţii fără a-l altera în mod sensibil. Se poate admite că în aceste împrejurări, diferitele aspecte ale biochimismului muscular provocate de curent se încadrează în biochimismul muşchiului normal. Din contră, curenţii electrici prea puternici, ale căror caracteristici respectiv durata de acţiune depăşesc anumite limite, alterează muşchiul mai mult sau mai puţin, ceea ce se repercutează într-un fel sau altul asupra biochimismului muşchiului. Fenomenele biochimice care se produc în muşchi în aceste împrejurări, reprezintă biochimismul unui muşchi alterat. Este evident că natura alterării şi gradul de alterare a muşchiului sub acţiunea curenţilor electrici prea puternici pot varia de la caz la caz, aşa că şi repercusiunile alterării asupra biochimismului muscular pot fi şi ele diferite. În unele condiţii, alterarea poate fi pasageră, muşchiul revenind după un timp oarecare la starea sa fiziologică normală şi la biochimismul său normal; în alte cazuri însă, alterarea provocată de curentul electric poate fi atît de profundă, încît condiţionează perturbări durabile în desfăşurarea fenomenelor biochimice musculare.

Cu toate acestea, în general nu se acordă suficientă atenţie acestei probleme: lucrările publicate nu conţin totdeauna suficiente date cu privire la caracteristicile excitaţiei electrice folosite şi la condiţiile ei de aplicare şi, de aceea, uneori lucrările respective nu pot fi reproduse cu precizia şi siguranţa necesară; de obicei nu se explică de ce s-a recurs la curentul electric avînd anumite caracteristici şi nu altele; în fine, la interpretarea rezultatelor obţinute şi la compararea lor cu rezultatele altor cercetări, caracteristicile excitaţiilor folosite nu se iau totdeauna în consideraţie. Semnificativ este şi faptul că de obicei nu se controlează şi nu se compară starea muşchiului înainte şi după excitaţie, deşi un astfel de control ar permite evitarea unor erori de interpretare cauzate de eventualele alterări ale muşchiului condiţionate de curentul electric folosit. Toate acestea se datoresc, poate, împrejurării că cele mai multe lucrări de pînă acum cu privire la biochimismul muscular au fost efectuate mai ales pe muşchi izolaţi din organism şi aflaţi în stare de supravieţuire şi nu în condiţii normale de viaţă, iar aceste condiţii de lucru nu ridică probleme privind interdependenţa dintre starea şi biochimismul muşchiului trecut prin excitaţii şi starea organismului întreg.

Începînd cercetările pentru lămurirea diferitelor aspecte ale biochimismului muscular, în condiţiile muşchiului *in situ*, am socotit necesar să încercăm elaborarea unui test care, măcar în primă aproximaţie, să permită precizarea condiţiilor de aplicare a curentului electric prin controlul înainte şi după excitaţie a stării muşchiului supus cercetării.

În acest scop am recurs la fenomenul exosmozei, dat fiind că viteza exosmozei diferitelor substanţe din ţesuturi depinde, între altele, de gradul de permeabilitate a ţesuturilor, iar acesta la rîndul lui variază în funcţie de starea fiziologică a ţesuturilor respective. Astfel, în anumite condiţii experimentale, fenomenul acesta se pretează atît la cercetarea evoluţiei proceselor biochimice în diferite ţesuturi şi organe, cît şi la caracterizarea stării funcţionale a acestora [4]. Spre exemplificare, menţionăm că cercetînd exosmoza ionilor acidului fosforic din seminţele grîului de toamnă,

am obținut unele indicații cu privire la evoluția în cursul iarovizării a raportului dintre intensitatea proceselor de hidroliză și de sinteză a compușilor organici fosforilați [5]; urmărind exosmoza ionilor de amoniu din același material, s-au putut preciza unele etape ale metabolismului proteic în semințele de grîu supuse iarovizării [6]; prin măsurarea conductometrică a exosmozei electroliților din pielea de om *in situ*, a fost elaborată o metodă pentru caracterizarea stării funcționale a pielii în diferite condiții normale și patologice, metodă care prezintă perspectiva aplicării în laboratorul clinic [7].

Trecînd acum la cercetarea fenomenului de exosmoză la mușchi, ne-am oprit asupra ionilor acidului fosforic, care formează ceea ce se numește curent „fosforul anorganic". Această alegere se datorește faptului că printre diferitele substanțe care se găsesc în țesutul muscular și care puteau fi luate în considerație, fosforul anorganic este acela a cărui exosmoză din mușchi, precum și din alte organe și țesuturi animale, a mai fost cercetată de G. Embden și E. Adler [8], H. Lange și N. Henning [9], G. M. Eggleton [10], M. A. Magath, E. J. Smailovskaia și M. I. Kolomietz [11], E. J. Harris [12] și alții. Deși au urmărit rezolvarea altor probleme, unii dintre acești cercetători au ajuns la constatări importante din punctul de vedere al investigațiilor noastre. Așa de exemplu G. Embden și E. Adler [8] au constatat că mușchiul gastrocnemian de broască izolat din organism și introdus în soluție Ringer cedează acesteia, într-un timp relativ scurt, cantitatea suficientă de fosfor anorganic pentru a fi dozată prin micrometodele analitice curente; tot ei au demonstrat că excitarea mușchiului izolat prin curent faradic duce la o accelerare considerabilă a exosmozei fosforului anorganic din acel mușchi; au stabilit de asemenea, că între eliminarea fosforului anorganic și starea de oboseală a mușchiului izolat există o anumită dependență; au explicat faptele experimentale amintite, admițînd că straturile mărginașe ale mușchiului, cu permeabilitatea redusă în stare de repaus, devin în urma excitației foarte permeabile pentru ionii acidului fosforic, care trec astfel cu ușurință din interiorul fibrelor musculare în lichidul interfibrilar și de aici în soluția salină înconjurătoare; această creștere a permeabilității reprezintă, după ei, o consecință a imbibiției straturilor mărginașe ale mușchiului cu acizi și în special cu acid lactic, format în mușchi datorită contracției provocată de excitare.

După toate aceste precizări, se poate trece la formularea raționamentului de bază al investigațiilor noastre experimentale. Dacă admitem principial că starea mușchiului și activitatea lui biochimică *in situ* nu sînt afectate de curentul electric folosit pentru excitație, atunci ar urma ca exosmoza fosforului anorganic din mușchi, înainte și după excitație să fie totdeauna aceeași, indiferent de puterea curentului folosit; în cazul contrar însă, ar fi de așteptat ca exosmoza fosforului anorganic să fie aceeași numai în cazul cînd caracteristicile excitației electrice nu depășesc anumite limite specifice categoriei mușchilor respectivi, limite în cadrul cărora mușchiul poate reveni la starea inițială după un timp relativ scurt de la întreruperea excitației electrice. Orice depășire a acestor

limite ar trebui să aibă drept efect apariţia unor diferenţe în intensitatea exosmozei înainte şi după excitaţie, diferenţe care ar urma să fie cu atît mai mari şi mai durabile cu cît alterarea muşchiului, provocată de curentul electric, va fi mai profundă.

În vederea stabilirii modului de experimentare, trebuie menţionat că verificarea directă a raţionamentului de mai sus pe muşchi *in situ* întîmpină dificultăţi, datorită faptului că în aceste condiţii exosmoza fosforului anorganic nu poate fi măsurată pe unul şi acelaşi muşchi de două ori : înainte şi după excitare. Dacă s-ar dovedi însă că exosmoza fosforului anorganic din muşchii simetrici nesupuşi excitaţiilor ai aceluiaşi animal are aceeaşi valoare, problema ar putea fi rezolvată prin cercetări pe animale la care numai unul din cei doi muşchi ar fi supus acţiunii curentului electric.

În cazul contrar, ar urma să se lucreze pe loturi mari de animale, stabilindu-se prin calcul statistic valorile medii ale exosmozei atît la muşchii animalelor din lotul nesupus acţiunii curentului electric, cît şi la muşchii din lotul animalelor excitate prin curent. Printre alte condiţii, se pot aminti următoarele : muşchii supuşi cercetării urmează să se afle *in situ*, atît înainte şi în timpul excitaţiei, cît şi după excitaţie ; pentru măsurarea intensităţii exosmozei fosforului anorganic, muşchii vor fi izolaţi din organism şi introduşi într-o soluţie salină corespunzătoare ; se va evita orice acţiune prealabilă asupra animalului de experienţă care s-ar putea repercuta asupra stării şi biochimismului muscular, ca : distrugerea măduvii spinării, decapitarea, anestezia, răcirea etc.

În consecinţă, s-a elaborat următoarea tehnică de lucru, cu respectarea condiţiilor stabilite anterior pentru cercetarea biochimismului muscular *in situ* [2], [3].

S-a lucrat pe broaşte (*Rana ridibunda Pall.*) capturate în jurul oraşului Bucureşti în perioadele aprilie-iulie şi septembrie-decembrie 1961. Broaştele se aduceau în laborator cu cel puţin 24 de ore înainte de experienţă şi se legau de suportul aparatului cu cel puţin 10 min înainte de excitare.

În cazul cînd trebuia recurs la excitare electrică, aceasta s-a făcut cu ajutorul unui tren de impulsuri rectangulare de la un cronaximetru tip „TU R" RS_3 — electrodele nepolarizabile, formate din fire de argint clorurate, fiind legate pe de o parte de bornele aparatului (prin intermediul unor rezistenţe, ca în lucrările anterioare), iar pe de altă parte de piciorul animalului prin înfăşurarea electrodelor la nivelul extremităţilor muşchiului gastrocnemian. După excitare, la momentul dinainte stabilit, se retezau ambele picioare ale broaştei şi se proceda la izolarea muşchilor gastrocnemieni în minimum de timp posibil. Această operaţie trebuia făcută cu o deosebită atenţie, pentru evitarea oricărei leziuni a muşchilor, deoarece muşchii lezaţi elimină în cursul exosmozei cantităţi foarte mari de fosfor anorganic. Operaţia de scoatere a muşchilor se făcea la nivelul tendoanelor, evitîndu-se totodată secţionări repetate ale nervilor sciatici respectivi.

O dată izolat, fiecare muşchi se introducea imediat în cîte un pahar mic cu 7 ml soluţie salină complexă 0,7%, preparată după L. Jendrassik [1]. Exosmoza se realiza la temperatura laboratorului (20 ± 2°C)

și dura 2 ore și treizeci de minute în condițiile agitării continue a soluției saline printr-un curent slab și uniform de aer.

După trecerea timpului fixat pentru exosmoză, se luau cît 6 ml soluție salină, se adăuga 1 ml soluție de acid tricloracetic 20% și după 10 min se filtra prin filtru cantitativ.

Dozarea fosforului anorganic în soluția deproteinizată s-a făcut după Fiske-Subbarow [13], prin tratarea a 5 ml filtrat cu 1 ml soluție molibdat de amoniu 2,5% în acid sulfuric 3 N și 0,4 ml soluție eikonogen 0,25%. După dezvoltarea culorii (10 min), s-a colorimetrat la fotocolorimetrul tip FEK cu filtru roșu. Citirile s-au exprimat în mg P după o curbă etalon și s-au raportat la întreaga cantitate de soluție salină folosită pentru exosmoză.

Aplicînd această tehnică de lucru, s-a efectuat întîi o serie de determinări ale exosmozei fosforului anorganic din mușchii gastrocnemieni de broască, care nu au fost supuși în prealabil nici unei excitații, broaștele fiind ținute în repaus pe stativul aparatului de excitare electrică timp de 10—15 min, în condiții identice cu cele în care trebuiau ținute broaștele care urmau să fie excitate. Din datele obținute (tabela 1) rezultă că în condițiile cercetării noastre, mușchii gastrocnemieni simetrici neexcitați ai aceleiași broaște aflate în prealabil în repaus, lasă să difuzeze în soluția salină înconjurătoare în timpuri egale cantități aproape egale

Tabela 1

Exosmoza fosforului anorganic din mușchii gastrocnemieni de broască în soluție salină 0,7%
Temperatura : 20 ± 2°C ; durata exosmozei : 2 ore și 30 min

Nr. crt.	Data experienței 1961	Greutatea mușchiului g		Exosmoza fosforului anorganic exprimată în γ P		$R = \frac{s}{d}$
		stîng	drept	Din mușchiul stîng (s)	Din mușchiul drept (d)	
1	5.V.	0,57	0,55	9	10	0,9
2	5.V.	0,55	0,55	13	15	0,9
3	5.V.	0,35	0,40	12	15	0,8
4	5.V.	0,45	0,50	9	8	1,1
5	6.V.	0,45	0,50	11	12	0,9
6	6.V.	0,40	0,41	7	5	1,4
7	6.V.	0,30	0,30	18	20	0,9
8	6.V.	0,45	0,45	32	34	0,9

de fosfor anorganic, ceea ce face ca raportul R între intensitatea exosmozei din mușchiul stîng și aceea din mușchiul drept să varieze în jurul cifrei 1. În schimb, cantitățile de fosfor anorganic care ies prin exosmoză din mușchii diferitelor broaște, variază în limite mari de la broască la broască, ceea ce arată că factorul individual joacă aici un rol important. Faptul că mușchii gastrocnemieni simetrici ai aceluiași animal prezintă aceeași exosmoză a fosforului anorganic, arată că se poate trece la experiențe cu excitarea electrică numai a unuia dintre mușchi, în vederea comparării valorilor exosmozei fosforului anorganic obținute la mușchiul excitat, cu acelea obținute pe mușchiul gastrocnemian simetric neexcitat.

Prima serie de determinări s-a făcut excitînd unul dintre muşchii gastrocnemieni (la unele broaşte se excita muşchiul drept, iar la altele — cel stîng) timp destul de îndelungat (10 min) cu un curent relativ intens (6,5 mA) şi cu ritmul de excitaţii destul de ridicat (60 imp/min). Imediat după terminarea excitării muşchiului *in situ*, se retezau ambele picioare ale broaştei şi se determina exosmoza fosforului anorganic în condiţiile amintite. Se constată (tabela 2) că la toate broaştele pe care s-a experimentat, muşchiul excitat a cedat în timpuri egale soluţiei saline înconjurătoare o cantitate mult mai mare de fosfor anorganic decît muşchiul simetric neexcitat, raportul R dintre intensitatea exosmozei la

Tabela 2

Exosmoza fosforului anorganic din muşchii gastrocnemieni de broască după excitarea prealabilă a unuia dintre muşchi timp de 10 min cu un tren de impulsuri de 6,5 mA şi 60 imp/min, retezarea picioarelor broaştei fiind făcută imediat după terminarea excitaţiei
Temperatura : 20 ± 2°C; durata exosmozei : 2 ore şi 30 min

Nr. crt.	Data experienţei 1961	Greutatea muşchiului g		Exosmoza fosforului anorganic exprimată în γ P		$R = \frac{e}{n}$
		excitat	neexcitat	Din muşchiul excitat (e)	Din muşchiul neexcitat (n)	
1	3.VI	0,55	0,55	56	15	3,7
2	3.VI	0,60	0,55	138	45	3,1
3	3.VI	0,55	0,45	230	110	2,1
4	5.VI	0,50	0,50	84	26	3,2
5	5.VI	0,78	0,75	105	29	3,6
6	5.VI	0,70	0,75	120	36	3,3
7	6.VI	0,75	0,70	105	19	5,5
8	6.VI	0,55	0,50	97	29	3,3

muşchiul excitat şi aceea la muşchiul neexcitat fiind în general mai mare de 2. Înseamnă că curentul electric relativ puternic, aplicat unuia dintre muşchii gastrocnemieni de broască, intensifică exosmoza fosforului anorganic de peste două ori în comparaţie cu aceea a muşchiului simetric neexcitat. Rezultă de aici că curentul electric puternic provoacă o modificare a stării muşchiului care nu numai că nu revine la normal imediat după terminarea excitaţiei, dar persistă după retezarea piciorului. Mai mult : cu ocazia urmăririi exosmozei, s-a putut observa că muşchii care au fost excitaţi devin mai mult sau mai puţin rigizi, în timp ce muşchii neexcitaţi nu prezintă acest fenomen. Aceasta constituie încă o indicaţie că curentul electric folosit pentru excitaţie a provocat o anumită alterare a muşchiului.

Pentru a stabili dacă o astfel de modificare a stării muşchiului este sau nu de lungă durată, am efectuat o serie de determinări ale exosmozei fosforului anorganic din muşchii gastrocnemieni supuşi aproximativ aceleiaşi excitaţii ca în seria determinărilor precedente (durata 10 min ; 6,5 mA ; 50 imp/min), cu deosebire că după excitaţie muşchiul excitat rămînea *in situ* 24 de ore (broasca fiind între timp eliberată) şi abia atunci se proceda la retezarea picioarelor şi la măsurarea exosmozei.

Datele cuprinse în tabela 3 arată că și în acest caz exosmoza fosforului anorganic din mușchiul excitat rămîne mărită față de exosmoza din mușchiul simetric neexcitat, raportul R depășind cifra 1. Aceasta înseamnă că curentul electric aplicat a alterat profund mușchiul și că starea de alterare a persistat timp destul de îndelungat.

Din moment ce curentul electric prea puternic alterează mușchiul aflat *in situ*, era de așteptat ca curenții electrici mai slabi să producă numai modificări trecătoare ale însușirilor mușchiului. Pentru verificare a acestei supoziții am efectuat, pe trei loturi de broaște, o nouă serie de

Tabela 3

Exosmoza fosforului anorganic din mușchii gastrocnemieni de broască după excitarea prealabilă a unuia dintre mușchi timp de 10 min, cu un tren de impulsuri de 6,5 mA și 50 imp/min, retezarea picioarelor broaștei fiind făcută 24 ore după excitare

Temperatura : 20 ± 2°C ; durata exosmozei : 2 ore și 30 min

Nr. crt.	Data experienței 1961	Greutatea mușchiului g		Exosmoza fosforului anorganic exprimată în γ P		$R = \frac{e}{n}$
		excitat	neexcitat	Din mușchiul excitat (e)	Din mușchiul neexcitat (n)	
1	6.IX.	0,65	0,65	38	13	2,9
2	6.IX.	0,80	0,70	33	24	1,3
3	7.IX.	0,75	0,80	24	22	1,1
4	7.IX.	0,75	0,75	228	122	1,8
5	7.IX.	0,45	0,50	20	12	1,6
6	7.IX.	0,60	0,60	30	12	2,4
7	8.IX.	0,70	0,60	47	31	1,5
8	8.IX.	1,10	1,05	59	26	2,2

determinări excitînd unul dintre mușchii gastrocnemieni timp de numai 1 minut, adică de 10 ori mai scurt decît înainte, cu un curent ceva mai puțin intens (5 mA în loc de 6,5 mA) și reducînd aproape la jumătate numărul de impulsuri (36 imp/min, în loc de 60). La un lot de broaște picioarele erau retezate imediat după terminarea excitării, la un alt lot retezarea se făcea după 3 ore, iar la ultimul lot de animale picioarele se retezau după 24 de ore de la excitare. După cum rezultă din datele obținute (tabela 4), în cazul broaștelor la care picioarele au fost retezate imediat după excitare, se poate constata o creștere apreciabilă a exosmozei fosforului anorganic la mușchii excitați în comparație cu exosmoza din mușchii simetrici neexcitați, valorile raportului R fiind cuprinse între cifrele 1 și 2. La broaștele din celelalte două loturi, exosmoza fosforului anorganic din ambii mușchi simetrici se face la fel, ca și cum nici unul dintre mușchi nu ar fi fost în prealabil excitat, raportul R prezentînd valori care variază în jurul cifrei 1. Rezultă că în aceste condiții, curentul electric provoacă apariția unor alterări de scurtă durată, care după 3 ore nu mai pot fi sesizate, datorită revenirii mușchiului la starea normală.

În fine, era de aşteptat ca curentul electric şi mai slab decît în experienţele precedente să nu producă modificări sesizabile ale exosmozei. De aceea am efectuat încă o serie de determinări ale exosmozei fosforului anorganic din muşchi gastrocnemieni de broască, reducînd de data aceasta la jumătate nu numai timpul de excitare a unuia dintre muşchi (30 s în loc de 1 min), dar şi intensitatea curentului electric (3,0 mA în loc de 6,5, respectiv 5,0 mA); am păstrat numai acelaşi ritm de impulsuri ca în seria de determinări precedente (36 imp/min). Retezarea picioarelor se făcea imediat după terminarea excitării. Rezultatele experimentale obţinute (tabela 5) au confirmat aşteptările: se constată că exosmoza fosforului anorganic din muşchii excitaţi se face cu aceeaşi intensitate

Tabela 4

Exosmoza fosforului anorganic din muşchii gastrocnemieni de broască după excitarea prealabilă a unuia dintre muşchi timp de 1 min cu un tren de impulsuri de 5 mA şi 36 imp/min, retezarea picioarelor fiind făcută fie imediat, fie la 3 ore, fie la 24 ore după excitare

Temperatura: 20 ± 2°C; durata exosmozei: 2 ore şi 30 min

Nr. crt.	Data experienţei 1961	Greutatea muşchiului g		Exosmoza fosforului anorganic exprimată în γ P		$R = \frac{e}{n}$
		excitat	neexcitat	Din muşchiul excitat (e)	Din muşchiul neexcitat (n)	
		Lot I. Picioarele retezate imediat după terminarea excitării				
1	25.X	0,55	0,50	74	42	1,7
2	25.X.	0,85	0,85	80	42	1,9
3	25.X.	0,70	0,70	56	46	1,2
4	25.X.	0,65	0,65	156	102	1,5
5	25.X.	0,45	0,50	33	22	1,5
		Lot II. Picioarele retezate la 3 ore după terminarea excitării				
1	2.XI.	0,60	0,70	45	37	1,2
2	2.XI.	0,60	0,70	16	18	0,9
3	2.XI.	0,70	0,65	9	11	0,8
4	4.XI.	0,65	0,60	97	97	1,0
5	4.XI.	0,60	0,60	90	97	0,9
		Lot III. Picioarele retezate la 24 de ore după terminarea excitării				
1	31.X.	0,65	0,60	39	42	0,9
2	31.X.	0,65	0,70	16	15	1,0
3	31.X.	0,60	0,65	18	20	0,9
4	2.XI.	0,70	0,70	61	57	1,1
5	2.XI.	0,70	0,75	45	39	1,1

ca şi din muşchii neexcitaţi (raportul R avînd valori ce variază în jurul cifrei 1), deşi curentul electric a acţionat în timpul excitării asupra muşchilor respectivi şi a provocat contracţia lor. Înseamnă că curentul electric suficient de slab nu provoacă alterări ale muşchiului sezisabile prin testul exosmozei în condiţiile noastre de lucru.

Materialul experimental prezentat în această lucrare demonstrează că excitarea prealabilă, cu un tren de impulsuri rectangulare provenite de la un cronaximetru „TU R" RS_3 a mușchiului gastrocnemian de broască (*Rana ridibunda Pall.*) aflat *in situ*, poate modifica acele însușiri ale mușchiului care intervin în fenomenul exosmozei ionilor acidului fosforic (fosfor anorganic). Într-adevăr, mușchiul scos din organism imediat sau la cîtva timp după excitare și introdus într-o soluție salină de tip Ringer, cedează acesteia fosfor anorganic, iar intensitatea acestui proces (adică intensitatea exosmozei ionilor acidului fosforic din mușchi) depinde de tratamentul la care a fost în prealabil supus. Curentul electric relativ slab (3 mA, 36 imp/min, timp de 30 s

Tabela 5

Exosmoza fosforului anorganic din mușchii gastrocnemieni de broască după excitarea prealabilă a unuia dintre mușchi timp de 30s cu un tren de impulsuri de 3mA și 36 imp/min, retezarea picioarelor broaștei fiind făcută imediat după terminarea excitării

Temperatura: 20 ± 2°C; durata exosmozei: 2 ore și 30 min

Nr. crt.	Data experienței 1961	Greutatea mușchiului g		Exosmoza fosfatului anorganic exprimată în γ P		$R = \frac{e}{n}$
		excitat	neexcitat	Din mușchiul excitat (e)	Din mușchiul neexcitat (n)	
1	20.XII	0,65	0,60	156	142	1,1
2	20.XII.	0,45	0,45	107	109	0,9
3	20.XII.	0,45	0,55	175	188	0,9
4	20.XII.	0,45	0,45	90	83	1,1
5	20.XII.	0,60	0,60	98	105	0,9
6	21.XII.	0,60	0,60	103	103	1,0
7	21.XII.	0,55	0,55	98	94	1,0
8	21.XII.	0,40	0,40	212	201	1,1

nu modifică această exosmoză; curentul ceva mai puternic (5 mA, 36 imp/min, timp de 1 min) provoacă o creștere trecătoare a exosmozei; curentul relativ puternic (6,5 mA, 50—60 imp/min, timp de 10 min) face ca creșterea exosmozei să se manifeste chiar și după 24 de ore de la excitație. Aceasta înseamnă că modificările ce pot fi provocate în mușchi în urma unei excitații prea puternice devin persistente : mușchiul nu revine la starea sa inițială imediat după încetarea trecerii curentului electric și, în consecință, modificările respective pot fi considerate ca alterări. În sprijinul acestei concluzii vine și faptul că mușchiul prin care a trecut un curent prea puternic nu numai că își schimbă comportarea la exosmoză, dar totodată devine mai mult sau mai puțin rigid, fenomen ce nu se constată la mușchiul neexcitat prealabil sau excitat slab. Rezultă că prin urmărirea exosmozei fosforului anorganic din mușchi, în condițiile precizate în această lucrare, se poate ajunge la stabilirea unui test care să permită caracterizarea și controlul stării mușchiului înainte și după excitare, precum și stabilirea condițiilor de aplicare a curentului electric în cercetarea biochimismului muscular. Este însă evident că testul acesta, ca și orice test, nu poate servi la caracterizarea stării generale a mușchiului ci numai a anumitor aspecte ale ei.

În ceea ce priveşte mecanismul fenomenelor care stau la baza acestui test, urmează să fie luaţi în consideraţie factorii care pot determina intensificarea exosmozei fosforului anorganic după excitarea muşchiului. Printre aceştia pot fi menţionate modificările permeabilităţii musculare pentru ionii acidului fosforic şi eventualele modificări ale concentraţiei acestor ioni în interiorul ţesutului muscular, ca urmare a proceselor fizico-chimice, biochimice şi fiziologice care se petrec în muşchi în cursul excitării şi contracţiei. Rolul acestor factori în modificările exosmozei fosforului anorganic din muşchi provocate de curentul electric este în curs de cercetare.

Prezentată la redacţie
la 8 august 1962

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
Bucureşti

ЭКСОСМОС НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФОРА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ СОСТОЯНИЯ МЫШЦЫ

ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ СООБЩЕНИЕ

РЕЗЮМЕ

Для характеристики состояния икроножной мышцы лягушки, предварительно подвергнутой электрическому возбуждению, предлагается измерять интенсивность эксосмоса фосфатов. Хотя под влиянием возбуждения эксосмос фосфатов значительно усиливается, все же, в случае, если возбуждение по интенсивности и по продолжительности не превысило некоторого предела, эксосмос фосфатов из мышцы вновь становится через сравнительно короткий промежуток времени нормальным, характерным для предварительно невозбужденной мышцы. Если же возбуждение слишком сильно и продолжительно, эксосмос не становится нормальным даже через длительный промежуток времени (например 24 часа); это показывает, что в подобных случаях электрический ток вызывает изменения в мышце. Авторы считают, что использование этого или подобных этому показателей будет способствовать выяснению различия в биохимизме между нормальной и потерпевшей в результате возбуждения электрическим током мышцами.

L'EXOSMOSE DU PHOSPHORE INORGANIQUE COMME TEST DE L'ÉTAT DU MUSCLE

NOTE PRÉLIMINAIRE

RÉSUMÉ

Pour caractériser l'état du muscle gastrocnémien de grenouille préalablement soumis à une excitation électrique, on propose un test fondé sur l'évaluation de l'intensité de l'exosmose des phosphates. Quoique considérablement accrue par l'excitation, l'exosmose des phosphates

musculaires revient après un délai relativement bref à des valeurs normales, caractéristiques pour le muscle non excité au préalable, lorsque l'excitation ne dépasse pas une certaine limite en durée et en intensité. Quand l'excitation est trop forte et trop prolongée, l'exosmose ne revient plus à des valeurs normales même après un temps plus long (par exemple 24 heures), ce qui prouve que dans de tels cas le courant électrique produit une altération du muscle. Les auteurs considèrent que l'utilisation d'un tel test, ou d'autres tests similaires, dans les recherches portant sur le biochimisme musculaire, contribuera à l'établissement des différences entre le biochimisme du muscle normal et celui d'un muscle altéré par l'action du courant électrique.

BIBLIOGRAFIE

1. L. JENDRASSIK, I. FAISZT, *Die ersten chemischen Prozesse der Muskelkontraktion.* Annales Universitatis Scientiarum Budapestinensis de Rolando Eötvös nominatae, Sectio Biologica, **1**, 133 (1957).
2. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, C. DRAGOMIRESCU, *Fosfagenul în diferite stări de activitate și excitabilitate musculară.* Studii și cercet. biochimie, **IV**, *2*, 171 (1961).
3. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, *Nivelul fosfagenului în diferite stări funcționale ale mușchiului.* Studii și cercet. biochimie, **V**, *2*, 207 (1962).
4. E. MACOVSCHI, *Exosmoza ca mijloc de cercetare a evoluției proceselor biochimice în semințele plantelor de cultură și rolul ei în stimularea și germinarea acestor semințe.* Com. Acad. R.P.R., **V**, *8*, 1171 (1955).
5. E. MACOVSCHI, V. PANAITIDE, *Exosmoza fosforului anorganic din semințele grîului de toamnă A_{15} în cursul iarovizării.* Com. Acad. R.P.R., **V**, *5*, 811 (1955).
6. E. MACOVSCHI, O. ZAHARIA, N. MOLDOVEANU, *Evoluția glutenului și a ionilor de amoniu ca aspecte ale metabolismului proteic din semințele grîului de toamnă A_{15} supuse iarovizării.* Bul. științ. Acad. R.P.R., **VII**, *2*, 199 (1955).
7. E. MACOVSCHI, S. COMOROȘAN, *Cercetări conductometrice asupra exosmozei electroliților din piele.* Studii și cercet. chimie, **IV**, *3—4*, 271 (1956). *Konduktometrische Untersuchungen der Elektrolytexosmose aus der Haut.* Ärztliche Forschung, **XII**, *5* (S. II/41—II/43), 2 (1958).
8. G. EMBDEN, E. ADLER, *Über die physiologische Bedeutung des Wechsels des Permeabilitätszustandes von Muskelfasergrenzschichten.* Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie, **118**, 1 (1922).
9. H. LANGE, N. HENNING, *Weitere Untersuchungen an überlebenden Tumorschnitten.* Arch. Exp. Path. u. Pharmak., **131**, 119 (1928).
10. G. M. EGGLETON, *Diffusion of inorganic phosphate into and out of the skeletal muscles and bones of the frog.* J. Physiol., **79**, 31 (1933).
11. M. A. MAGATH, E. J. SMAILOVSKAIA, M. I. KOLOMIETZ, *Zur Frage nach den Energiequellen der Tumorzelle. Untersuche über die Phosphatausscheidung vergifteter Tumor und Leberschnitte.* Ztschr. für Krebsforschung, **40**, *30*, 259 (1934).
12. E. J. HARRIS, *Phosphate liberation from isolated frog muscle* (University College London). J. Physiol., **122**, 366 (1953).
13. C. H. FISKE, Y. SUBBAROW, *The colorimetric determination of phosphorus,* J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).

PURIFICAREA HIALURONAT LIAZEI *) PRIN CROMATOGRAFIE PE DEAE-SEPHADEX

DE

EUGENIA SORU
MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R.P.R.

şi

FLORICA IONESCU-STOIAN

Pentru purificarea hialuronat liazei testiculare au fost propuse o serie de metode, unele implicînd precipitări fracţionate saline şi cu etanol la o temperatură sub 0° [1], iar altele precipitări saline combinate cu cromatografia pe răşini — Amberlite IRC-50 [2] sau Amberlite XE-64 [3].

Problema obţinerii enzimei sub forma unui preparat omogen cotinuă însă să fie actuală, realizarea unui asemenea preparat fiind importantă atît pentru studiul său chimic — stabilirea relaţiei dintre structura chimică şi activitatea enzimatică — cît şi pentru aplicarea hialuronidazei în terapeutică.

În cele ce urmează relatăm o metodă de purificare a hialuronat liazei care foloseşte în ultimă etapă cromatografia pe un nou tip de schimbător de ioni, dietilaminoetil Sephadex [4], [5] (DEAE-Sephadex) **). Acesta are capacitate mare, absorbţie nespecifică mică şi ne-a permis obţinerea în condiţii de tehnică simplă a unui preparat activ şi electroforetic omogen.

MATERIAL ŞI METODE

1. Acidul hialuronic folosit ca substrat este preparat din cordoane ombilicale, printr-o dublă digestie triptică şi peptică, în condiţii de tehnică standard [6]. Îndepărtarea proteinelor a fost realizată prin tratare ul-

*) Denumirea de hialunorat liază a fost propusă de către Comisia de nomenclatură a enzimelor — *Raport of the Comission on enzymes of the International Union of Biochemistry*, Pergamon Press, 1961 — pentru a înlocui denumirea de hialuronidază.

**) DEAE-Sephadex A-50 a fost pus la dispoziţia noastră de Pharmacia Upsala-Suedia.

terioară cu cloroform (metoda Sevag). Se păstrează sub formă liofilizată. Produsul obținut corespunde constantelor indicate [6], [7].

2. *Activitatea enzimatică* se determină folosind metoda standard turbidimetrică, adoptată de Organizația mondială a sănătății (O.M.S.) [8] pentru testarea etalonului internațional de hialuronidază. Se exprimă activitatea în unități de turbiditate (unități de reducere a turbidității) TRU/mg proteină.

3. *Material testicular.* Testicule bovine proaspăt recoltate sînt decapsulate, mărunțite şi introduse în acetonă, unde se mențin cîteva zile, schimbînd acetona. După îndepărtarea acetonei prin filtrare, fragmentele testiculare sînt uscate în vid la 40°C. Sub formă astfel uscată se pot păstra mai multă vreme, fără o pierdere importantă a activității enzimatice. Folosirea de testicule deshidratate cu acetonă şi uscate drept material de plecare pentru extragerea enzimei are avantajul de a procura un extract inițial cu un conținut mai mic de proteine balast decît extractul obținut din material testicular proaspăt. De exemplu, din materialul deshidratat s-a obținut un extract brut cu o activitate de 75,2 unități de turbiditate/mg proteină, pe cînd din materialul proaspăt se obține un extract cu o activitate de numai 37,44 TRU/mg proteină.

4. *Pregătirea coloanei de DEAE-Sephadex.* Se foloseşte DEAE-Sephadex A-50 (medium) (100—250 ochiuri), capacitate de schimb 3,1 meq/g, care se ciclizează cu HCl 0,5 M şi NaOH 0,5 M.

Pulberea de DEAE-Sephadex se lasă în suspensie în apă bidistilată, iar după depunerea particulelor se înlătură prin decantare particulele fine. Depozitul este spălat pe pîlnie Büchner, succesiv, cu HCl 0,5 M, apă distilată, NaOH 0,5 M, apă distilată; gelul astfel pretratat se echilibrează cu tamponul la care se va lucra ulterior şi se introduce într-o coloană de 20 × 80 mm, prevăzută la partea inferioară cu o placă poroasă de sticlă. Introducerea schimbătorului ionic DEAE-Sepahdex în coloană se face cu aceleaşi precauțiuni ca şi pentru ceilalți schimbători de ioni.

5. *Metoda de purificare a hialuronat liazei.* Metoda de purificare cuprinde următoarele etape:

a) Materialul testicular deshidratat cu acetonă şi uscat este trecut prin maşina de tocat şi supus timp de 4 ore, la temperatura de +4°C, unei prime extracții acide, cu un amestec de acid acetic 0,1 M şi acid clorhidric 2 M, în proporție de 190 :10. Se favorizează extracția supunînd amestecul unei agitări mecanice continue.

b) Omogenatul acid este centrifugat la +4°C, iar supernatantul conținînd enzima brută este tratat cu sulfat de amoniu la 30% saturare. În această etapă se precipită o parte din proteinele de balast, care sînt îndepărtate prin centrifugare.

c) Supernatantul 30% saturare este adus la 60% saturare în sulfat de amoniu şi menținut 20 de ore la +4°C pentru precipitarea completă a enzimei (şi a unei părți din proteinele de balast).

d) Recoltarea prin centrifugare a precipitatului obținut la 60% saturare (preparat I) şi dializa precipitatului față de apă bidistilată (+4°C) pînă la îndepărtarea totală a sulfatului.

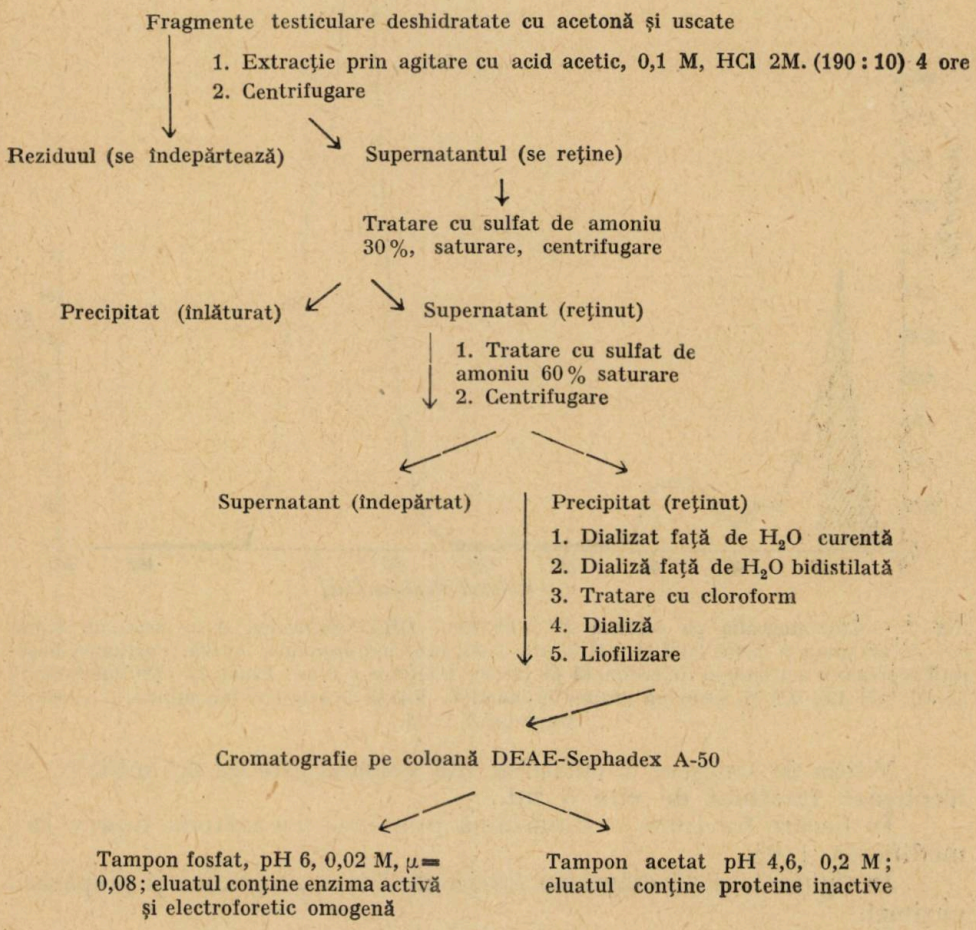
e) Tratarea dializatului cu cloroform (2 :1 v/v) şi agitare la agitatorul mecanic timp de 15 min (+ 4°C).

f) O nouă dializă a soluţiei, după tratare cu cloroform, faţă de apă bidistilată (24 de ore la +4°C).

g) Concentrarea dializatului prin dializă faţă de polivinilpirolidon, repartizarea în fiole şi liofilizarea preparatului. Se obţine o pulbere albă, uşor solubilă în apă şi enzimatic activă. Este preparatul II.

SCHEMA PROCEDEULUI DE PURIFICARE A HIALURONAT LIAZEI

(toate operaţiile se efectuează la + 4°C)



h) Cromatografia pe coloană DEAE-Sephadex A-50 (medium) — pregătită astfel cum s-a descris la capitolul *Material şi metode.* Coloana (20 × 80 mm) este echilibrată cu tampon fosfat, pH 6,0, 0,02 M, $\mu = 0{,}08$.

Se introduc în partea de sus a coloanei 2 ml soluţie preparat II, în tamponul menţionat care conţine 48 mg proteină şi o activitate enzimatică totală de 450 TRU.

Soluţia proteică este introdusă în coloană şi apoi se adaugă soluţia tampon cu care s-a echilibrat iniţial coloana.

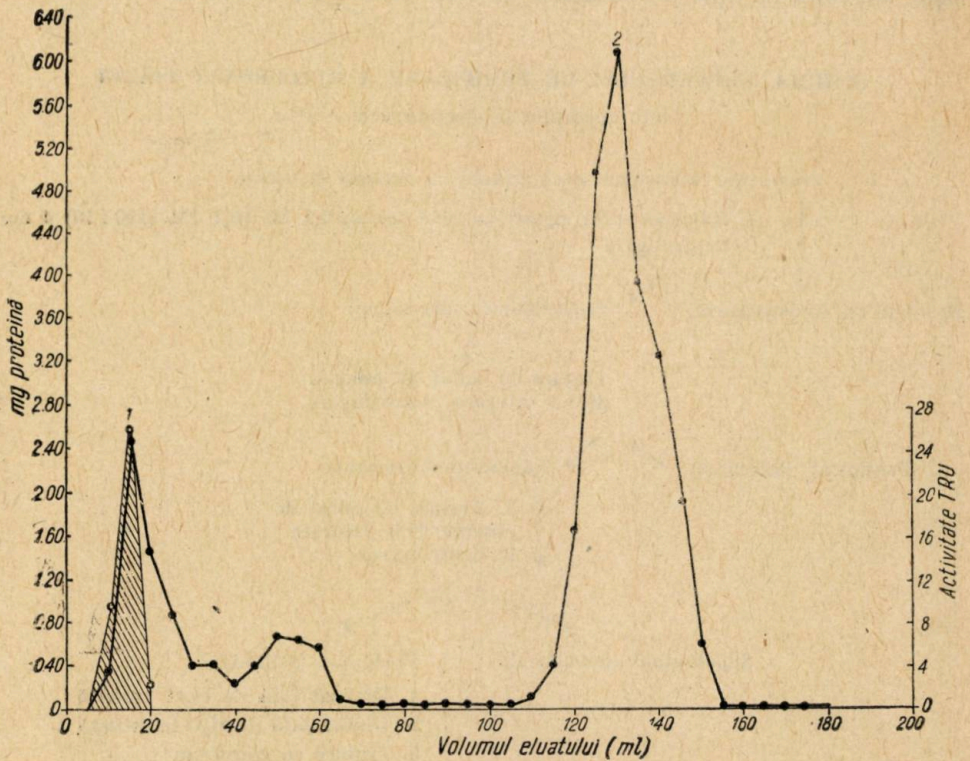


Fig. 1. — Cromatografia pe coloană 20 × 80 mm, DEAE-Sephadex A-50 medium. Eluat 5 — 40 ml tampon fosfat 0,02 M, pH 6, $\mu = 0{,}08$, proteină enzimatic activă. Porţiunea haşurată reprezintă activitatea determinată pe fiecare fracţiune a 5 ml. Eluat 40—180 ml tampon acetat, pH 4,6, 0,2 M, proteină enzimatic inactivă. Viteză de scurgere 0,5 ml/min; colectare fracţiuni a 5 ml.

Viteza de scurgere a eluatului din coloană este de 0,5 ml/min. Se recoltează fracţiuni de cîte 5 ml.

În fiecare fracţiune se determină proteinele cu metoda Lowry [9], modificată [10].

În figura 1 se dă diagrama fracţionării cromatografice şi preparării enzimei.

În condiţiile noastre experimentale fracţiunea activă nu este adsorbită pe coloană, ci trece foarte repede în eluant (tamponul 0,02 M, pH 6,0, $\mu = 0{,}08$, cu care s-a echilibrat coloana).

După 20 ml eluat se obţine un prim pisc (nr. *1*) care coincide cu piscul major al activităţii enzimatice (fig. 1).

Se continuă eluția cu același tampon, recoltînd fracțiuni de cîte 5 ml, pînă ce în eluat nu se mai pun în evidență proteine (în total 100 ml). În acest moment se introduce în coloană tampon acetat de sodiu, pH 4,6, 0,2 M și se recoltează în continuare fracțiuni de cîte 5 ml (0,5 ml/min), controlînd în fiecare fracțiune prezența proteinelor.

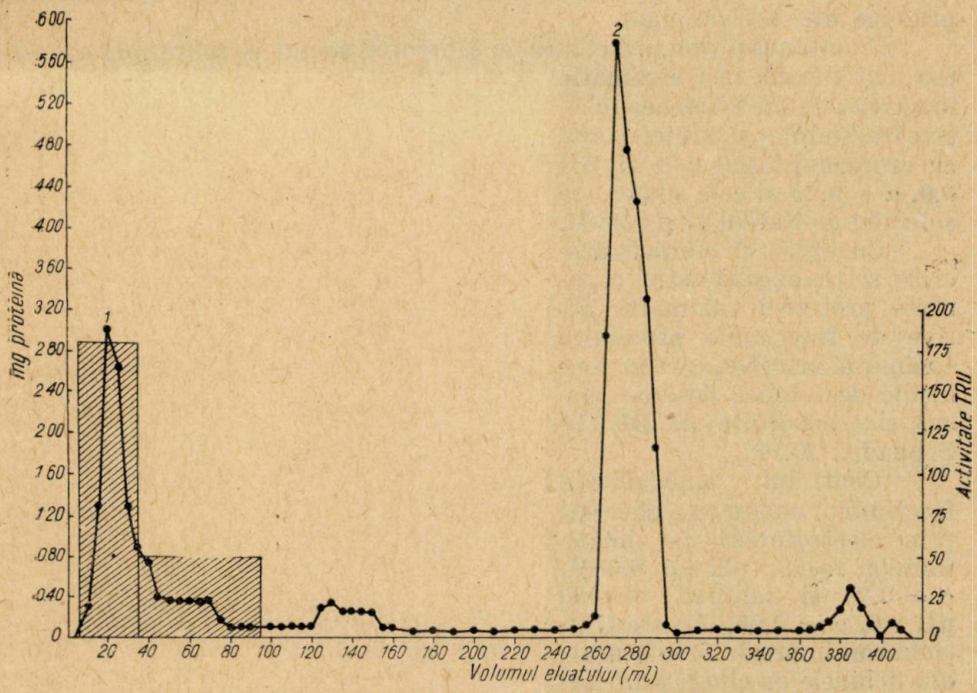


Fig. 2. — Cromatografie pe coloană 20 × 80 mm, DEAE-Sephadex A-50 medium. Eluatul 0—95 ml reprezintă proteina enzimatic activă eluată cu tampon fosfat 0,02 M, pH 6, $\mu = 0,08$; eluatul 95—260 ml tampon fosfat 0,05 M, $\mu = 0,20$, proteină enzimatic inactivă; eluatul 260—300 ml tampon acetat de sodiu, pH 4,6 proteină enzimatic inactivă; eluatul 360—400 ml soluție de clorură de sodiu 0,38 M, proteină enzimatic inactivă: porțiunea hașurată corespunde amestecului de fracțiuni eluate între 5 și 95 ml de tamponul fosfat 0,02 M, pH 6, enzimatic active.

După eluarea a circa 30 ml (deci după 130 ml eluat total) se obține al doilea pisc proteinic major (nr. 2), care coincide cu momentul echilibrării coloanei cu tamponul acetat, pH 4,6. Proteinele corespunzătoare acestui pisc nu au activitate enzimatică.

Se continuă eluarea cu același tampon pînă ce în lichidele de eluție nu se mai pun în evidență proteine. În acest moment (140 ml) se introduce în coloană o soluție de NaCl 0,17 M și ulterior o soluție de NaCl 0,38 M, care eluează încă urme de proteine (fracțiunile 140—285 ml) fără activitate enzimatică.

În unele experienţe, după eluţia cu tampon fosfat 0,02 M, μ=0,08 s-a introdus ca eluant tampon fosfat 0,5 M, pH 6,0, μ=0,20 şi ulterior tamponul acetat, pH 4,6. Tamponul fosfat 0,05 M eluează unele proteine de balast (fig. 2).

Se determină pe toate fracţiunile eluate atît activitatea enzimatică, cît şi conţinutul în proteine. Activitatea enzimatică este acumulată numai în fracţiunile din eluatul tampon fosfat 0,02 M, pH 6,0, μ = 0,08.

Piscul de activitate enzimatică coincide cu piscul concentraţiei proteice din acelaşi eluat.

Fracţiunea proteinică eluată cu tamponul acetat de sodiu, pH 4,6 este cea mai bogată, însă enzimatic inactivă; sînt de asemenea inactive fracţiunile proteinice eluate cu tamponul fosfat 0,05 M, pH 6,0, μ = 0,20 şi cele eluate cu soluţiile de NaCl 0,17 şi 0,38 M.

Cu ajutorul tehnicii descrise se realizează astfel separarea proteinei enzimatic active de fracţiunile proteinice enzimatic inactive, care în condiţiile de tehnică descrise mai sus sînt adsorbite de DEAE-Sephadex A-50.

Controlul omogenităţii fracţiunilor eluate este efectuat prin electroforeză pe hîrtie, tampon fosfat, pH 6,0, 0,06M, μ = 0,24 şi tampon veronal pH 8,0, μ = 0,05. Aceste fracţiuni sînt în prealabil înlăturate din lichidele de eluţie prin dializă faţă de apă bidistilată, şi concentrate prin dializă faţă de polivinilpirolidon.

În figura 3 se dă imaginea electroforetică a preparatului brut, înainte de trecerea pe coloană, şi a fracţiunilor corespunzătoare celor 2 piscuri (nr. *1* — eluţie tampon fosfat 0,02 M şi nr. *2* — eluţie tampon acetat pH 4,6, 0,2 M).

Fracţiunile corespunzătoare proteinei enzimatic active (pisc nr. *1*) prezintă o singură bandă electroforetică distinctă foarte apropiată de punctul

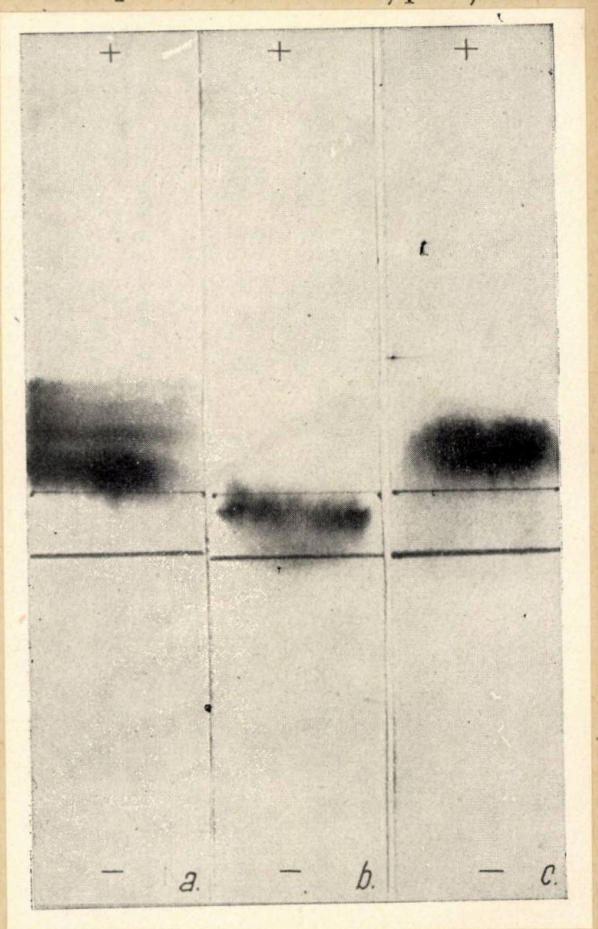


Fig. 3. — Electroforeza pe hîrtie Whatman nr. 1; tampon fosfat, pH 6, 0,06 M.
a — preparatul brut; *b* — fracţiunea enzimatic activă, corespunzătoare piscului nr. *1* din figurile 1 şi 2; *c* — proteină enzimatic inactivă, corespunzătoare piscului nr. *2* din figurile 1 şi 2.

de start, ceea ce indică o viteză de migrare foarte mică, fapt demonstrat şi de alţi autori [11].

Fracţiunile corespunzătoare piscului nr. *2* prezintă de asemenea o bandă omogenă electroforetic însă cu o viteză de migrare mult mai mare decît fracţiunea enzimatic activă.

Condiţiile de cromatografie descrise au avantajul de a permite numai adsorbţia proteinelor enzimatic inactive, însă nu realizează adsorbţia enzimei pe schimbătorul ionic, astfel că aceasta trece în primele fracţiuni eluate împreună cu tamponul de echilibrare a coloanei. Astfel, nu este necesar un gradient complicat de lichide de eluţie pentru eliberarea enzimei de pe coloană, fapt care simplifică mult procesul de separare şi purificare a acesteia.

În ceea ce priveşte controlul cantitativ al procesului de purificare, datele sînt următoarele :

Se recuperează 41,613 mg din cantitatea de 48 mg proteine introduse în coloană, deci 86,6% din proteinele iniţiale.

Se recuperează 227 TRU din activitatea de 450 TRU introdusă în coloană în lichidul eluant, după dializă şi concentrare faţă de polivinilpirolidon.

Experienţe efectuate pentru a localiza etapa în care are loc pierderea de activitate au dus la concluzia că aceste pierderi nu au loc în timpul trecerii enzimei prin coloană, ci în timpul dializei şi concentrării eluatelor. Aceste manipulări duc într-adevăr la o pierdere de activitate de aproximativ 50% a enzimei purificate. Ele trebuie evitate sau eventual realizate în prezenţa unui stabilizant al acestei enzime [6], [12], labilitatea enzimei purificate fiind cu atît mai mare cu cît preparatul enzimatic este mai pur [13], [14].

Prezentată la redacţie
la 25 mai 1962

Laboratorul de biochimie generală,
Institutul „Dr I. Cantacuzino",
Bucureşti

ОЧИСТКА ГИАЛУРОНАТ-ЛИАЗЫ ПУТЕМ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ НА DEAE-Sephadex

РЕЗЮМЕ

Гиалуронат-лиаза семенников получается в виде активного энзиматического препарата, гомогенного с электрофоретической точки зрения, при помощи нового ионообменного вещества Диэтиламиноэтил Сефадекс (Deae-Sephadex A-50 средний). Это вещество является сетчатым декстраном, обладающим свойствами молекулярного сита ионообменного вещества.

В работе сначала описаны условия получения неочищенного препарата, содержащего 4—5 отдельных электрофоретических фракций; затем описываются условия изготовления колонки ионообменного вещества, а также возможности фракционирования на этой колонке компонентов неочищенного препарата.

Установленные экспериментальные условия (природа буфера, pH, полярность, ионная сила) обладают тем преимуществом, что и адсорбция на колонке неактивных энзиматических белков (т. е. балластных белков), а также позволяют выделение с самого начала элюирования энзиматически активной и электрофорестически однородной составляющей . Это преимущество позволяет избежать сложных манипуляций элюирования со многократными градиентами и упрощает получение очищенного фермента.

Получение очищенной гиалуронат-лиазы имеет большое значение как для химического исследования этого фермента и установления соотношения между химическим строением и энзиматической активностью, так и для получения чистого, активного препарата в терапевтических целях.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Хроматографирование на колонке 20 × 80 мм. Элюат 5 — 40 мл, буфер — 0,02 М, раствор фосфата. pH = 6, μ = 0,08, энзиматически активный белок. Заштрихованная область представляет активность, определенную для каждой фракции объемом 5 мл. Элюат 40—180 мл, буфер — 0,2 М, раствор ацетата, pH = 4, 6, энзиматически неактивный белок. Скорость прохождения через колонку 0,5 мл/мин; собраны фракции по 5 мл.

Рис. 2. — Хроматографирование на колонке 20 × 80 мм. DEAE-Sephadex A—50 средний. Элюат 0—95 мл представляет энзиматически активный белок, буфер — 0,02 М, раствор фосфата, pH = 6, μ = 0,08.
Элюат 95—260 мл, буфер — 0,06 М, раствор фосфата, μ = 0,20, энзиматически неактивный белок.
Элюат 260—300 мл, тампон — уксуснокислый натрий, pH = 4,6, энзиматически неактивный белок. Элюат 360—400 мл 0,38 М раствора хлористого натрия, энзиматически неактивный белок: заштрихованная область соответствует смеси элюированных от 5 до 95 мл фракций, буфер — 0,02 М . раствор фосфата, pH = 6, энзиматически активный белок.

Рис. 3. — Электрофорез на ватманской бумаге № 1; буфер — 0,06 М, раствор фосфата; pH = 6; *a*) неочищенный препарат; *b*) энзиматически активная фракция, соответствующая пику № 1 на рис. 1 и 2; *c*) энзиматически неактивный белок, соответствующий пику № 2 на рис. 1 и 2.

PURIFICATION DE L'HYALURONATE-LYASE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-Séphadex

RÉSUMÉ

On décrit tout d'abord les conditions d'obtenir le produit brut, qui contient 4—5 fractions électrophorétiques distinctes ; ensuite la préparation de la colonne d'échange ionique et les conditions du fractionnement sur cette colonne des composants du produit brut.

Les conditions expérimentales établies (la nature du tampon, le pH, la molarité, la force ionique) offrent l'avantage de réaliser l'adsorption sur la colonne des protéines enzymatiquement inactives, donc du ballast protéique, et de permettre au composant enzymatique actif et homogène du point de vue électrophorétique d'effluer au début même de l'élution de la colonne. Cet avantage évite les manipulations compliquées de l'élution aux gradients multiples et simplifie le procédé d'obtenir l'enzyme purifiée.

La purification de l'hyaluronate-lyase est importante tant pour l'étude chimique de cette enzyme et pour l'établissement d'une corrélation entre la structure chimique et l'activité enzymatique, que pour obtenir un produit pur, actif, à des fins thérapeutiques.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Chromatographie sur colonne 20 × 80 mm DEAE-Séphadex A-50 médium ; éluat 5 — 40 ml, tampon phosphate 0,02 M, pH 6, $\mu = 0,08$, protéine enzymatiquement active. La portion aux hachures représente l'activité déterminée pour chaque fraction de 5 ml.

Eluat 40—180 ml tampon acétate 0,2 M, pH 4,6, protéine enzymatiquement inactive. Vitesse d'écoulement 0,5 ml/minute ; fractions à 5 ml chacune.

Fig. 2. — Chromatographie sur colonne 20×80 mm DEAE-Séphadex A-50 médium.

L'éluat 0—95 ml représente la protéine enzymatiquement active, éluée avec tampon phosphate 0,02 M, pH 6, $\mu = 0,08$.

L'éluat 95—260 ml tampon phosphate 0,05 M, $\mu = 0,20$, protéine enzymatiquement inactive.

L'éluat 260—300 ml tampon acétate de sodium, pH 4,6, protéine enzymatiquement inactive.

L'éluat 360—400 ml tampon chlorure de sodium 0,38 M, protéine enzymatiquement inactive.

La portion aux hachures correspond au mélange des fractions éluées entre 5 et 95 ml par le tampon phosphate 0,02 M, pH 6, enzymatiquement actives.

Fig. 3. — Electrophorèse sur papier Whatman n° 1, tampon phosphate 0,06 M, pH 6 ; *a*) produit brut ; *b*) fraction enzymatiquement active correspondant au sommet n° 1 des figures 1 et 2 ; *c*) protéine enzymatiquement inactive correspondant au sommet n° 2 des figures 1 et 2.

BIBLIOGRAFIE

1. H. TINT, R. BOGASH, J. Biol. Chem., **184**, 50 (1950).
2. P. S. RASSMUSSEN, Biochim. Biophys. Acta, **14**, 567 (1954).
3. B. HOGBERG, Acta Chem. Scand., **8**, 1098 (1954).
4. P. FLODIN, *Proc. of the Fifth International Congress of Biochem.*, Moscova, 1961.
5. J. PORATH, E. B. LINDNER, Nature, **191**, 69 (1961).
6. British Pharmacopoeia, App. **XVIII**, 1958, 960.
7. United States Pharmacopoeia, Ed. a XV-a, 329.
8. Bulletin O.M.S., **16**, 291 (1957).
9. O. H. LOWRY, N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR, R. J. RENDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
10. G. L. MILLER, Annal. Chem., **31**, 964 (1959).
11. ANTONIO CAPUTO, Nature, **173**, 358 (1954).
12. R. BRUNISH, S. M. MOZERSKY, J. Biol. Chem., **231**, 291 (1958).
13. P. S. RASMUSSEN, Acta Chim. Scand., **8**, 633 (1954).
14. P. BERNFELD, L. P. TUTILE, R. W. HUBBARD, Arch. Biochem. and Biophys., **92**, 232 (1961).

CERCETĂRI CU PRIVIRE LA PROTEINELE DIN PLASMA SEMINALĂ

DE

L. M. BURUIANĂ, EL. HADARAG şi V. PAVLU

Proteinele plasmei seminale joacă un rol deosebit în diferitele etape ale procesului de fecundaţie.

În primul rînd ele intervin în mecanismele de mobilitate ale spermatozoizilor, asigurîndu-le acestora condiţiile hidrodinamice de propulsie.

În al doilea rînd proteinele plasmatice constituie o sursă energetică importantă pentru spermatozoizi.

Cercetări recente [3] au arătat că glucidele legate de proteinele plasmei sînt în cantitate de aproximativ 3 ori mai mare decît acelea din serul sangvin omolog.

Conţinutul ridicat în acizi uronici serveşte la neutralizarea toxinelor care apar de-a lungul traiectului sexual feminin, prelungind viabilitatea spermatozoizilor.

Numeroşi factori indispensabili în procesul de fecundaţie ca : fertilizina, antaglutinele, diverse kinine, apar în urma proceselor enzimatice care au loc după ejaculare şi care au ca substrat specific proteinele plasmatice.

Aceste proteine sînt secretate în special de testicul, epididim, vezicule seminale, prostată şi glandele lui Cowper. Contribuţia acestor glande anexe este diferită cu specia, vîrsta, afecţiunile sferei genitale etc., ceea ce explică existenţa unor diferenţe remarcabile în calitatea proteinelor plasmatice. Rezultatele diverselor cercetări confirmă acest fapt.

Trebuie să menţionăm de la început că proteinele plasmei seminale fac parte în majoritatea lor din clasa glicoproteinelor, fapt adesea trecut cu vederea. În afară de această categorie de substanţe proteice se mai întîlnesc cantităţi mici de albumină care după unii autori, G. Hermann [6], ar fi identică cu cea serică, iar după alţii, H. Dorn [4], ar fi diferită.

W. Schneider şi colaboratori [10] pun la îndoială, împreună cu alţi autori pe care îi citează, existenţa albuminei în plasma seminală.

După E. Pernot şi P. Szumowski [9], P. Szumowski [11], albumina din plasma seminală are o importanţă semiologică, cantităţi peste 3% denotă o spermă de calitate inferioară şi cu un număr mare de spermatozoizi anormali.

Procentul glicoproteinelor din plasma seminală oscilează între 70 şi 90%. Compoziţia lor diferă cu specia. Faptul a putut fi pus în evidenţă cu ajutorul analizei polarografice de L. M. Buruiană şi V. Pavlu [2] care au stabilit că polaro-activitatea plasmei seminale la om este mai mică decît aceea a altor specii.

În afară de albumină şi glicoproteine, în plasmă se găsesc şi cantităţi mici de nucleoproteide care provin din spermatozoizii lizaţi mecanic.

În lucrarea de faţă se prezintă o serie de date cu privire la unele particularităţi ale proteinelor din plasma seminală.

MATERIAL ŞI METODE DE LUCRU

Cercetările efectuate s-au executat asupra plasmei seminale de taur, berbec, vier şi om. Sperma proaspăt recoltată era centrifugată timp de 15 min cu viteza de 3 000 ture/min, se decanta plasma seminală în eprubete sterile care se păstrau acoperite la rece (+ 4°C).

În cazul spermei de om am folosit recomandările lui W. Schneider şi colaboratori [10], analiza electroforetică făcîndu-se după 48 de ore de la recoltare.

S-a efectuat analiza electroforetică pe hîrtie, utilizînd ca mediu electrolitic soluţia tampon veronal-medinal cu pH=8,6, μ=0,05 şi tampon acid acetic-acetat de sodiu cu pH = 4,7, μ = 0,1 şi care conţinea 1 mol uree la litru. Potenţialul curentului era de 6V/cm iar intensitatea de 1 mA pe bandă, durata 8 ore şi temperatura 22°C.

Încercările cu soluţii electrolit tampon fosfaţi, cu pH = 5,2, sau tampon acid lactic-acid propionic, cu pH = 2,6, nu au dat rezultate satisfăcătoare.

Seromucoidul s-a dozat cu metoda lui R. J. Winzler [12] modificată după cum urmează:

Într-o fiolă de centrifugă se pun 0,1—0,2 ml plasmă, completîndu-se pînă la 2,5 ml cu ser fiziologic. Se precipită proteinele în afară de seromucoid cu 2,5 ml acid tricloracetic 10% rece.

În tehnica originală se utiliza acid percloric 1,8 M care în cazul de faţă nu are acţiune precipitantă. Se lasă la rece 2 ore sau mai bine pînă a doua zi. Se centrifughează şi după centrifugare se adaugă la 2,5 ml supernatant 1 ml acid fosfotungstic care precipită seromucoidul. Se procedează mai departe ca în tehnica originală, exprimînd valoarea seromucoidului în tirozină.

Precipitatele obţinute cu acid tricloracetic şi seromucoidul au fost analizate după hidroliza acidă, determinîndu-se cu ajutorul cromatografiei circulare felul aminoacizilor conţinuţi. S-a folosit pentru irigare amestecul butanol-acid acetic-apă (4 : 1 : 5).

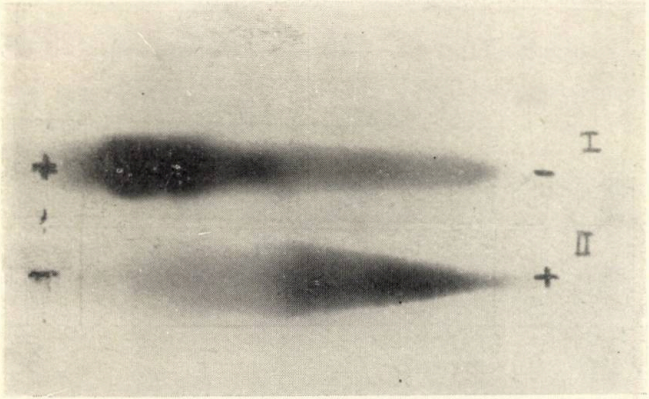


Fig. 1. — Electroforegrama plasmei seminale de taur.
I — În soluție tampon acetat pH 4,7 ; II — în soluție tampon veronal pH 8,6.

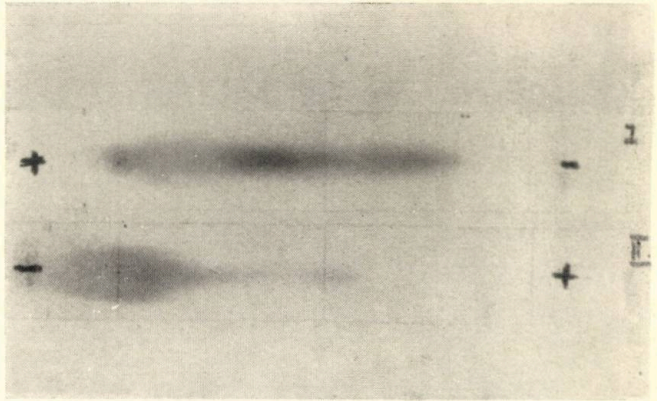


Fig. 2. — Electroforegrama plasmei seminale de om.
I — În soluție tampon acetat pH 4,7 ; II — în soluție tampon veronal pH 8,6.

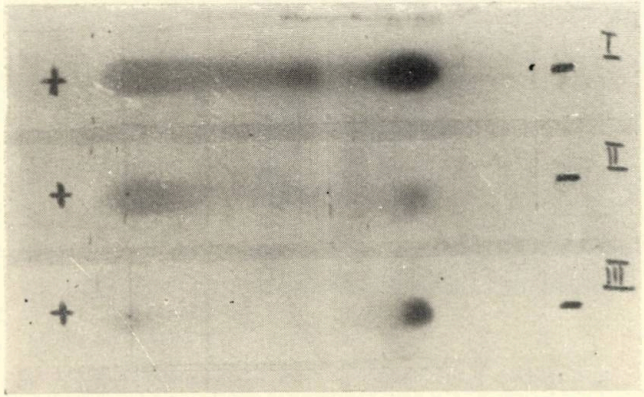


Fig. 3. — Electroforegrama plasmei seminale de vier.
I — Plasma seminală integrală, în soluție tampon acetat pH 4,7 ; II — fracțiunea separată prin precipitare la saturație cu sulfat de amoniu și apoi dializată ; III — fracțiunea precipitată la 50% saturație cu sulfat de amoniu și apoi dializată.

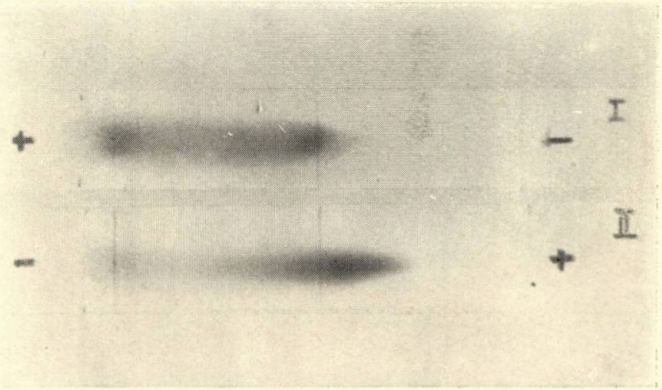


Fig. 4. — Electroforegrama plasmei seminale de berbec.
I — În soluție tampon acetat pH 4,7 ; II — în soluție tampon veronal pH 8,6.

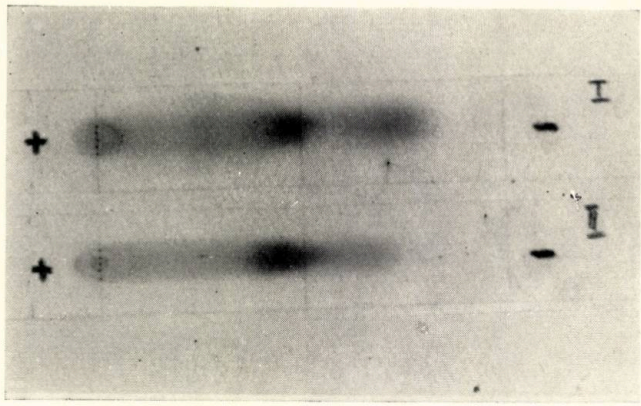


Fig. 5. — Electroforegrama plasmei seminale de om.
I — Plasma seminală integrală, în tampon acetat pH 4,7 ; II — fracțiunea precipitată cu acid triclor-acetic 10% și apoi dizolvată în NaOH.

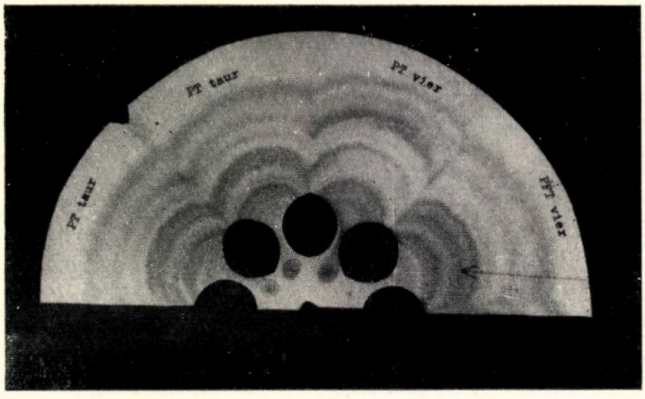


Fig. 6. — Cromatograma unor fracțiuni proteice din plasma seminală de taur și vier.
PT — precipitatul obținut cu acid tricloracetic ; PFT — precipitatul obținut cu acid fosfotungstic după îndepărtarea precipitatului cu acid tricloracetic (seromucoidul).

Acizii uronici din plasma seminală s-au dozat cu ajutorul tehnicii lui S. W. F. Hanson şi colaboratori [5], reacţia cu carbazol neputîndu-se utiliza din cauza conţinutului mare în glucide.

Analiza polarografică a filtratului s-a executat cu ajutorul polarografului Heyrovski M-301.

Filtratul se obţinea cu tehnica obişnuită prin defecare cu acid sulfosalicilic 20% [8], iar ca suport s-a utilizat soluţia Brdicka hexaminocobaltică (Co^{III}).

Determinarea cantitativă a proteinelor s-a făcut cu metoda Kjeldahl.

REZULTATELE OBŢINUTE

Separarea electroforetică a fracţiunilor proteice este puţin netă la pH 8,6. Rezultate mai bune se obţin în tampon cu pH 4,7 ceea ce este explicabil, deoarece punctul izoelectric al glicoproteinelor variază în jurul pH-ului 7.

Faptul este ilustrat în figurile 1—5.

În general plasma seminală de taur conţine cel mai mare număr de fracţiuni (7) distincte în raport cu a celorlalte specii (numai 3).

Rezultatele de mai sus scot în evidenţă bogăţia în glicoproteine a plasmei seminale şi explică conţinutul ridicat în glucide legate.

În literatură diferitele categorii de glicoproteine sînt împărţite în două clase principale, desemnate de Weimer şi colaboratori cu denumirea de fracţiunea M_1 şi M_2.

Fracţiunea M_1 este denumită de acelaşi autor seromucoid şi este constituită în cea mai mare parte din orosomucoid.

În cazul spermei, componenţii acestei fracţiuni au cea mai mică viteză de migrare. Se vede din figura 1 că ei constituie majoritatea glicoproteinelor din sperma de taur.

Viteza de migrare a fracţiunii precipitate cu acid tricloracetic este mai mare decît aceea a fracţiunii precipitate cu acid fosfotungstic (seromucoid).

Separarea fracţionată a plasmei seminale de vier cu sulfat de amoniu dă două fracţiuni principale, una cu o viteză mare de migrare în mediu acid (precipită la 50% saturaţie) şi alta cu viteză mică de migrare (precipită la 100% saturaţie) după cum se vede în figura 3.

Din aceste rezultate se poate trage concluzia că în spermă există în general două varietăţi principale de glicoproteine şi anume una corespunzătoare seromucoidului şi care poate fi precipitată cu sulfat de amoniu la saturaţie şi alta cu viteză mult mai mare de migrare, precipitabilă cu sulfat de amoniu la 50% saturaţie.

Diferenţa dintre viteza de migrare a acestor glicoproteine variază cu specia.

Analiza cromatografică a arătat o diferenţă remarcabilă în conţinutul în aminoacizi al celor două varietăţi de glicoproteine precipitate cu acizii tricloracetic şi fosfotungstic (fig. 6).

Semnalăm aici faptul că în hidrolizatul seromucoidului, la toate speciile apare un spot nou situat între glicocol şi treonină (sau alanină) şi care se colorează în roşu carmin cu ninhidrină.

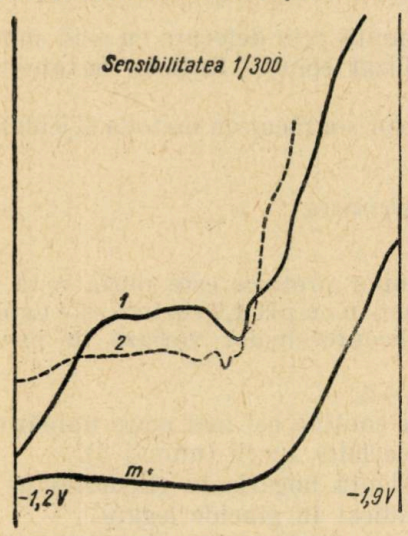


Fig. 7. — Plasma seminală de taur.
1 — Polarograma fracţiunii proteice precipitată cu sulfat de amoniu 50%. Concentraţia în proteină 2,8 mg%; 2 — polarograma filtratului sulfosalicilic al fracţiunii de mai sus.

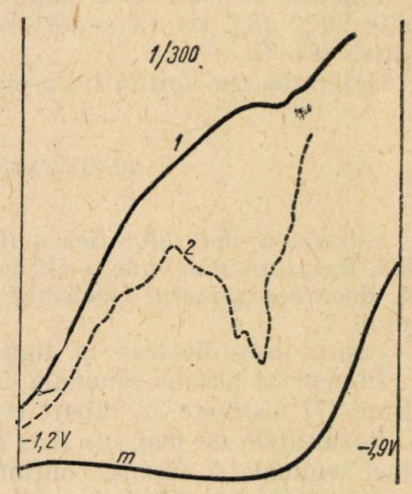


Fig. 8. — Plasma seminală de taur.
1 — Polarograma fracţiunii precipitată cu sulfat de amoniu la saturaţie. Concentraţia în proteină 1,7 mg %; 2 — polarograma filtratului sulfosalicilic al fracţiunii de mai sus.

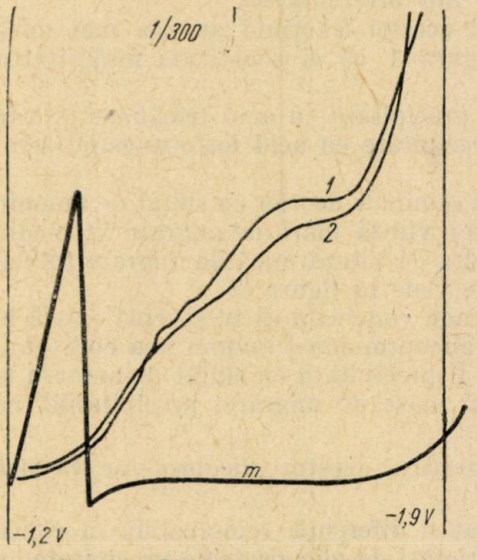


Fig. 9. — Plasma seminală de vier.
1 — Polarograma fracţiunii proteice precipitată cu sulfat de amoniu 50%. Concentraţia în proteină 7 mg%; 2 — polarograma filtratului sulfosalicilic.

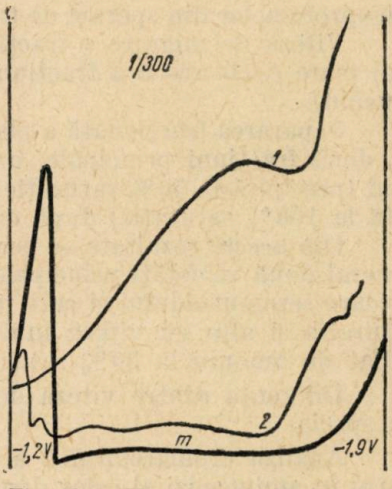


Fig. 10. — Plasma seminală de vier.
1 — Polarograma fracţiunii precipitate cu sulfat de amoniu la saturaţie. Concentraţia în proitenă 7 mg%; 2 — polarograma filtratului sulfo-salicilic.

Coloraţia apare mai greu şi este foarte persistentă. Cercetări în curs vor lămuri probabil natura acestui aminoacid, a cărui comportare cu ninhidrina nu a mai fost semnalată.

Analiza polarografică dă indicaţii preţioase cu privire la conţinutul în glicoproteinele acide (M_{-1} şi M_{-2}) V. Kalous [7] şi E. Bulle-Helaers [1].

S-a măsurat de aceea activitatea polarografică a plasmei seminale şi a fracţiunilor precipitate cu sulfat de amoniu, acid tricloracetic şi acid fosfotungstic.

Deosebit de activ este filtratul plasmei seminale de taur şi al celor două fracţiuni separate cu sulfat de amoniu (fig. 7 şi 8).

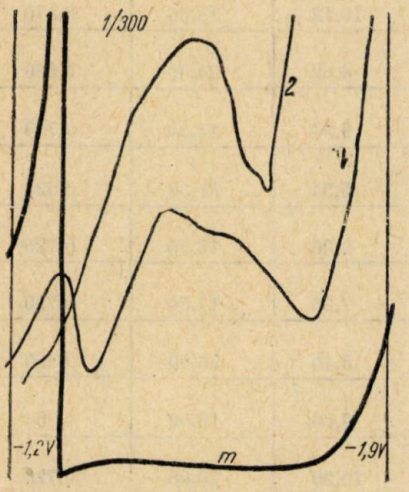


Fig. 11

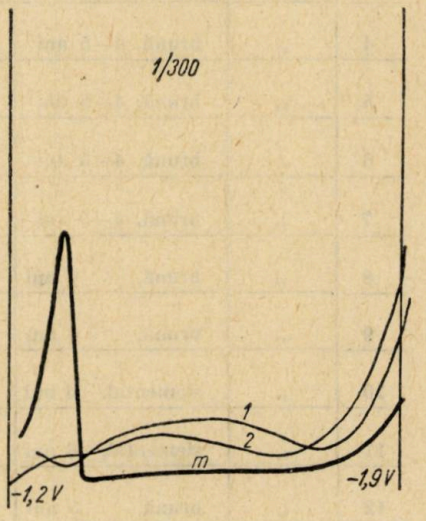


Fig. 12

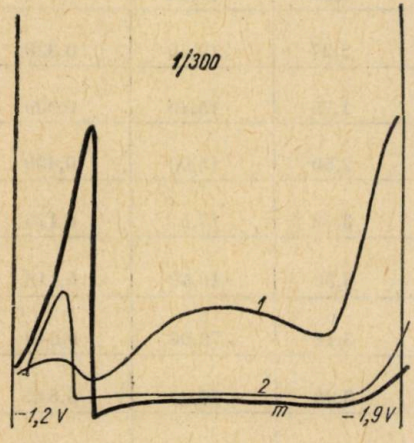


Fig. 13

Fig. 11. — Plasma seminală de taur.
1 — Polarograma filtratului sulfosalicilic al fracţiunii precipitate cu acid tricloracetic 10%; 2 — polarograma filtratului sulfosalicilic al fracţiunii precipitate cu acid fosfotungstic. Concentraţia în proteină înainte de precipitare cu acid sulfosalicilic 2,58 mg %.

Fig. 12. — Plasma seminală de om.
1 — Polarograma plasmei seminale integrale. Concentraţia în proteină 3,2 mg%; 2 — polarograma filtratului sulfosalicilic.

Fig. 13. Plasma seminală de berbec.
1 — Polarograma plasmei seminale integrale. Concentraţia în proteină 3 mg%; 2 — Polarograma filtratului sulfosalicilic. Activitatea polarografică nulă.

Tabelă

Compoziţia plasmei seminale

Nr.	Specia	Rasa şi vîrsta	Nr. sperm. 10^9/ml	Proteine g%	Seromucoid mg tirozină %	Acizi uronici în ac. glic. g%
1	Taur	brună, 4—5 ani	1,090	13,82	15,00	0,560
2	„	brună, 4—5 ani	0,520	4,11	22,10	0,530
3	„	brună, 4—5 ani	0,960	14,70	17,50	0,690
4	„	brună, 4—5 ani	1,150	10,12	18,30	0,570
5	„	brună, 4—5 ani	0,630	4,62	24,30	0,680
6	„	brună, 4—5 ani	0,980	9,84	19,30	0,700
7	„	brună, 4—5 ani	0,510	5,34	31,30	0,520
8	„	brună, 6 ani	0,840	9,06	18,50	0,720
9	„	brună, 6 ani	0,800	7,26	17,50	0,720
10	„	siemental, 6 ani	0,400	5,40	36,50	0,360
11	„	siemental, 6 ani	1,360	7,86	16,00	1,000
12	„	brună, 5 ani	0,860	10,20	20,00	0,720
13	Berbec	ţigae 3 ani	3,550	2,30	16,00	0,560
14	„	ţigae 3 ani	4,300	2,27	19,50	0,320
15	„	ţigae 3 ani	4,350	1,75	15,40	0,300
16	„	ţigae 3 ani	3,300	2,50	15,00	0,400
17	Vier	landrace	0,100	3,72	17,5	0,125
18	„	Marele alb	0,100	3,50	16,50	0,115
19	Om	40 ani	0,100	3,18	70,00	0,540
20	„	35 ani	0,082	3,98	70,00	0,840
21	„	50 ani	0,100	3,01	81,0	0,600

În cazul plasmei seminale de vier (fig. 9) filtratul fracțiunii separate prin saturare cu sulfat de amoniu 50% este mult mai activ decît al fracțiunii precipitate la 100% saturație (fig. 10).

Diferența între activitatea polarografică a fracțiunilor precipitate cu acizii tricloracetic și fosfotungstic se vede în figura 11.

Activitatea polarografică a filtratului proteinei precipitată cu acid fosfotungstic este mult mai mare decît a proteinei precipitate cu acid tricloracetic.

Demn de remarcat este faptul că plasma seminală de om este foarte puțin polaro-activă (fig. 12) iar cea de berbec, complet inactivă (fig. 13).

Comparînd datele electroforetice cu cele polarografice se poate deduce că diferitele fracțiuni proteice ale plasmei seminale, deși separate în aceleași condiții, se comportă în mod foarte diferit și că analiza electroforetică nu poate diferenția singură diversele fracțiuni proteice, viteza de migrare fiind mult influențată de natura componentei glucidice.

Determinările cantitative ale seromucoidului și ale acizilor uronici conținuți în glicoproteinele plasmatice au dat rezultatele înregistrate în tabelă de unde reiese că există o corelație între calitatea spermei și concentrația în seromucoid. O spermă bogată în spermatozoizi și avînd o concentrație mare în proteine conține cantități reduse de seromucoid. Această afirmație este valabilă numai în cazul spermei de taur. La celelalte specii, din cauza numărului redus de cazuri, nu se poate trage încă o concluzie precisă.

Subliniem însă că plasma seminală de om este mult mai bogată în seromucoid decît a celorlalte specii și că acesta crește în adenomul prostatic.

În ceea ce privește acizii uronici, cantitatea cea mai mică se găsește în sperma de vier și cea mai mare în cea de taur și om.

CONCLUZII

1. Proteinele plasmei seminale sînt constituite mai ales din globuline cu caracter acid. Separarea lor se poate realiza mai bine în tampon-acetat cu pH = 4,7, $\mu = 0{,}1$, decît în tampon veronal de pH = 8,6, $\mu = 0{,}05$.

2. Din spermele analizate, cea de taur conține cel mai mare număr de fracțiuni (7). Dintre ele, două sînt în cantitate mai mare și au o mobilitate corespunzătoare α_1-globulinelor serice. Ele corespund fracțiunii solubile în acid tricloracetic și precipitabilă cu acid fosfotungstic (seromucoid).

3. Prin separarea cu sulfat de amoniu, acid tricloracetic și acid fosfotungstic a proteinelor din plasma seminală a speciilor cercetate, se obțin fracțiuni care se comportă diferit din punctul de vedere al vitezei de migrare și al activității polarografice.

4. Conținutul în seromucoid al plasmei seminale variază cu specia. Sperma de vier conține cea mai mică cantitate, iar cea de om, cea mai mare. La taur există o corelație între conținutul în seromucoid și calitatea spermei. O spermă de bună calitate conține puțin seromucoid.

5. Acizii uronici intră în constituţia proteinelor plasmei seminale. Cea mai bogată spermă în acizi uronici este cea de taur, iar cea mai săracă, cea de vier.

Prezentată la redacţie
la 9 iulie 1962

Catedra de chimie biologică,
Facultatea de medicină veterinară, Bucureşti

ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ

РЕЗЮМЕ

В работе исследуется электрофоретическое поведение белков семенной плазмы некоторых видов животных.

Гликобелковая природа различных фракций выявляется как по направлению и скорости миграции в буферных растворах при pH = = 4,7, так и по полярографической активности сульфосалициловых фильтратов. Осаждение сернокислым аммонием, трихлоруксусной и фосфор-вольфрамовой кислотами дает фракции, различные в зависимости от вида.

Было констатировано, что между содержанием сывороточной слизи (фракция, осажденная фосфор-вольфрамовой кислотой) и качеством спермы существует связь, которую можно было бы практически использовать для определения этого качества.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Электрофореграмма семенной плазмы быка.
I — В буферном растворе ацетата pH — 4,7; *II* — в буферном растворе веронала pH = 8,6.

Рис. 2. — Электрофореграмма семенной плазмы человека.
I — В буферном растворе ацетата pH = 4,7; *II* — в буферном растворе веронала pH = 8,6.

Рис. 3. — Электрофореграмма семенной плазмы кабана.
I — Полная семенная плазма в буферном растворе ацетата pH = 4,7; *II* — фракция, выделенная при количественном осаждении сернокислым аммонием, а затем диализованная; *III* — фракция, осажденная при добавлении 50 % сернокислого аммония, а затем диализованная.

Рис. 4. — Электрофореграмма семенной плазмы барана.
I — В буферном растворе ацетата pH = 4,7; *II* — в буферном растворе веронала pH = 8,6.

Рис. 5. — Электрофореграмма семенной плазмы человека.
I — Полная семенная плазма, буфер — ацетат pH = 4,7; *II* — фракция, осажденная 10 % трихлоруксусной кислотой, а затем растворенная в NaOH.

Рис. 6. — Хроматограмма некоторых белковых фракций семенной плазмы быка и кабана.
PT — Осадок, полученный при обработке трихлоруксусной кислотой.
PFT — осадок, полученный фосфор-вольфрамовой кислотой после удаления осадка трихлоруксусной кислотой (сывороточная слизь).

Рис. 7. — Семенная плазма быка. *I* — Полярограмма белковой фракции, осаж-

денной сернокислым аммонием (50 %). Содержание белка 2,8 мг %; *2* — полярограмма сульфосалицилового фильтрата этой фракции.

Рис. 8. — Семенная плазма быка.

1 — Полярограмма фракции, осажденной сернокислым аммонием при насыщении. Содержание белка 1,7 мг %; *2* — полярограмма сульфосалицилового фильтрата этой фракции.

Рис. 9. — Семенная плазма кабана.

1 — Полярограмма белковой фракции, осажденной сернокислым аммонием (50 %). Содержание белка 7 мг %; *2* — полярограмма сульфасалицилового фильтрата.

Рис. 10. — Семенная плазма кабана.

1 — Полярограмма фракции, осажденной сернокислым аммонием при насыщении. Содержание белка 7 мг %; *2* — полярограмма сульфосалицилового фильтрата.

Рис. 11. — Семенная плазма быка.

1 — Полярограмма сульфосалицилового фильтрата фракции, осажденной трихлоруксусной кислотой (10 %); *2* — полярограмма сульфосалицилового фильтрата фракции, осажденной фосфор-вольфрамовой кислотой. Содержание белка до осаждения сульфосалициловой кислоты 2,58 мг %.

Рис. 12. — Семенная плазма человека.

1 — Полярограмма полной семенной плазмы. Содержание белка 3,2 мг %; *2* — полярограмма сульфосалицилового фильтрата.

Рис. 13. — Семенная плазма барана.

1 — Полярограмма полной семенной плазмы. Содержание белка 3 мг %; *2* — полярограмма сульфосалицилового фильтрата. Отсутствие полярографической активности.

RECHERCHES SUR LES PROTÉINES DU PLASMA SÉMINAL

RÉSUMÉ

On étudie le comportement électrophorétique des protéines du plasma séminal de quelques espèces animales.

On met en évidence la nature glycoprotéique des diverses fractions tant par le sens et la vitesse de migration dans des solutions tamponnées au pH = 4,7, que par l'activité polarographique des filtrats sulfosalicyliques. La précipitation au sulfate d'ammonium, à l'acide trichloracétique et à l'acide phosphotungstique conduit à des fractions différant entre elles suivant les espèces d'origine.

La corrélation qui existe entre le contenu en séromucoïde (fraction précipitée à l'acide phosphotungstique) et la qualité du sperme, pourrait être utilisée dans la pratique pour l'appréciation de cette dernière.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Electrophorégramme du plasma séminal de taureau.
I. En solution tampon acétate pH 4,7. II. En solution tampon véronal pH 8,6.

Fig. 2. — Electrophorégramme du plasma séminal d'homme.
I. En solution tampon acétate pH 4,7. II. En solution tampon véronal pH 8,6.

Fig. 3. — Electrophorégramme du plasma séminal de verrat.
I. Plasma séminal intégral, en solution tampon acétate pH 4,7. II. Fraction séparée par précipitation à la saturation avec du sulfate d'ammonium, puis dialysée. III. Fraction précipitée à 50 % de la saturation avec du sulfate d'ammonium, ensuite dialysée.

Fig. 4. — Electrophorégramme du plasma séminal de bélier.
I. En solution tampon acétate pH 4,7. II. En solution tampon véronal pH 8,6.

Fig. 5. — Electrophorégramme du plasma séminal d'homme.
I. Plasma séminal intégral, en tampon acétate pH 4,7. II. Fraction précipitée à l'acide trichloracétique 10% et ensuite dissoute dans NaOH.

Fig. 6. — Chromatogramme de quelques fractions protéiques du plasma séminal de taureau et de verrat.
PT — précipité obtenu à l'acide trichloracétique; PFT — précipité obtenu à l'acide phosphotungstique après élimination du précipité à l'acide trichloracétique (le séromucoïde).

Fig. 7. — Plasma séminal de taureau.
1. Polarogramme de la fraction protéique précipitée au sulfate d'ammonium à 50%, en protéine 2,8 mg %, *2.* Polarogramme du filtrat sulfosalicylique de cette fraction.

Fig. 8. — Plasma séminal de taureau.
1. Polarogramme de la fraction précipitée au sulfate d'ammonium saturé. Teneur en protéine 1,7 mg%. *2.* Polarogramme du filtrat sulfosalicylique de cette fraction.

Fig. 9. — Plasma séminal de verrat.
1. Polarogramme de la fraction protéique précipitée au sulfate d'ammonium 50%. Teneur en protéine 7 mg%, *2.* Polarogramme du filtrat sulfosalicylique.

Fig. 10. — Plasma séminal de verrat.
1. Polarogramme de la fraction précipitée au sulfate d'ammonium saturé. Teneur en protéine 7 mg%, *2.* Polarogramme du filtrat sulfosalicylique.

Fig. 11. — Plasma séminal de taureau.
1. Polarogramme du filtrat sulfosalicylique de la fraction précipitée à l'acide trichloracétique à 10%. *2.* Polarogramme du filtrat sulfosalicylique de la fraction précipitée à l'acide phosphotungstique. Teneur en protéine avant la précipitation à l'acide sulfosalicylique : 2,58 mg%.

Fig. 12. — Plasma séminal d'homme.
1. Polarogramme du plasma séminal intégral. Teneur en protéine : 3,2 mg%, *2.* Polarogramme du filtrat sulfosalicylique.

Fig. 13. — Plasma séminal de bélier.
1. Polarogramme du plasma séminal intégral. Teneur en protéine : 3 mg%. *2.* Polarogramme du filtrat sulfosalicylique. Activité polarographique nulle.

BIBLIOGRAFIE

1. BALLE-HELAERS E., *Polaroactivité quantitative des protides des milieux biologiques. Applications au dosage des protéines et des séromucoïdes sériques.* Advances in Polarography, **III**, 1111 (1960).
2. BURUIANĂ L. M., PAVLU V., *Le comportement polarographique du sperme*, Naturwiss., **22**, 589 (1957).
3. BURUIANĂ L. M., HADARAG El., *Sur les glucides liés du plasma séminal.* Naturwiss., 1962 (sub tipar).
4. DORN H., *Die Klinische Bedeutung der Biochemie des Spermaplasmas.* Arch. Klin. Exper. Dermatol., **213**, 720 (1961).
5. HANSON S. W. F., MILLS, WILLIAMS R. T., în J. LOISELEUR, *Techniques de Laboratoire*, **I**, 806 (1954).
6. HERMANN G., LICHT W., KEUTEL H. J., KING. E., *Zur Frage der Identität von menschlichen Spermaplasmaproteinen und Serumeiweissen.* Naturwiss., *11*, 268 (1958).
7. KALOUS V., *A contribution to the study of substances giving Brdicka's polarographic filtrate reaction.* Advances in Polarography, **III**, 1067 (1960).
8. MÜLLER O. H., *Polarographic behaviour of various plasma protein fraction*, în *Electrochemistry in Biology and Medicine.* Ed. by TH. SHEDLOWSKY, 301, 1955.
9. PERNOT E., SZUMOWSKI P., *Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique des protéines du plasma séminal de taureau.* Bull. Soc. Chim. Biol., **40**, 11 (1958).
10. SCHNEIDER W., NOWAKOWSKI H., VOIGT. K. D., *Die Papierelektrophorese von menschlichem Spermaplasma.* Klin. Wschr., **32**, 863 (1954).
11. SZUMOWSKI P., *Sur la biochimie pathologique du plasma séminal.* Rec. Méd. Vét., **137**, *11*, 835 (1961).
12. WINZLER R. J., *Determination of serumglycoproteins*, în D. GLICK, *Methods of Biochemical Analysis*, **III**, 279 (1955).

EFECTUL RADIAȚIILOR GAMMA (^{60}Co) ASUPRA CATALAZEI

DE

L. M. BURUIANĂ și V. PAVLU

Încă din 1832 Thénard, descoperitorul apei oxigenate, a observat că lichidele și țesuturile animale au însușirea de a descompune această substanță, liberînd oxigenul.

Substanța catalitică activă a fost identificată cu o proteină din grupa cromoproteidelor și denumită catalază. Multă vreme s-a crezut că rolul său constă în descompunerea peroxidului de hidrogen, care poate apărea în diferitele etape ale metabolismului tisular. Cercetările din ultima vreme au arătat că această enzimă joacă un rol esențial în lanțul proceselor respiratorii, ca acceptor de hidrogen și regulator al fluxului electronic terminal. Caracterul său catalazic este dublat de cel peroxidazic, primul avînd însă o importanță mai redusă în raport cu ultimul.

Atenția acordată catalazei a crescut în ultimul timp datorită faptului că ea poate constitui și o capcană a radicalilor liberi, care apar în urma radiolizei. Astfel H. Aebi, J. P. Heininger și H. Suter [1] arată că adăugarea de catalază împiedică formarea methemoglobinei în urma iradierii cu radiații X, datorită descompunerii peroxidului de hidrogen format prin unirea radicalilor liberi OH'.

O. I. Smirnova [13], injectînd la șobolani și șoareci trietilentetramin-Fe^{2+}, constată că o dată cu creșterea catalazei din sînge sporește și supraviețuirea după iradierea cu radiații X. În contradicție cu aceste date, unele cercetări experimentale au arătat că injectarea la animale a unor inhibitori ai catalazei , ca cianurile și sulfocianurile [9], azoturile, sulfurile, florurile și imidazolul [5], protejează contra efectului nociv al radiațiilor. În general se admite că enzimele care nu necesită grupări tiolice ca activatori, nu sînt influențate de iradieri.

Aceste considerente ne-au făcut să cercetăm efectul radiațiilor energetice asupra catalazei *in vitro*. Deoarece anterior s-a stabilit că metoda polarografică [3], [4] poate fi aplicată cu succes la studierea efectului

radiaţiilor asupra hemoproteinelor, am întreprins unele cercetări care fac obiectul acestei lucrări.

Metodă şi material de lucru. Ca sursă de catalază s-au întrebuinţat preparatele obţinute din ficat de cal, porc, găină şi eritrocite de cal. Pentru obţinerea lor s-a recurs la tehnica lui N. K. Sarkar şi J. B. Sumner [12] în cazul catalazei din ficat şi la tehnica lui S. E. Manoilov şi colaboratori [10] în cazul catalazei eritrocitare. Cu toată purificarea avansată, electroforegramele respective nu sînt unitare (fig. 1) ceea ce este explicabil în cazul hemin-enzimelor, care, la fel ca şi hemoglobina mamiferelor, pot suferi fenomene de asociere-disociere reversibile. Faptul este şi mai net în cazul catalazei eritrocitare (fig. 2). În acest caz electroforegrama obţinută cu preparatele cristalizate diferă de aceea a lui S. E. Manoilov, care în aceleaşi condiţii de lucru, prezintă 3 fracţiuni anodice şi 5 fracţiuni catodice.

Prin agitare cu amestec alcool : cloroform 1 : 1 electroforegrama se modifică treptat (fig. 2, electroforegramele *2* şi *3*) din cauza schimbării raportului hemină/globulină precum şi a distribuţiei electronice a legăturilor dintre gruparea prostetică şi lanţurile polipeptidice. Preparatele catalazice utilizate pentru determinările polarografice erau solvite în tampon fosfaţi m/10, pH 7,4. Activitatea lor se determina manganometric şi era de ordinul 200—400 (ceea ce reprezintă produsul dintre valoarea constantei de viteză din reacţia monomoleculară a descompunerii apei oxigenate şi 10^4 adică $K_V.10^4$). Pentru cercetarea efectului radiaţiilor, soluţiile erau expuse în tuburi de politenă la acţiunea radiaţiilor emise de o sursă de ^{60}Co cu doza debit de 5 mR/oră.

Pentru înregistrarea activităţii polarografice a soluţiilor catalazice s-a utilizat tehnica de mai jos. Se trasa polarograma unei soluţii martor de apă oxigenată, concentraţie $8{,}8 \times 10^{-4}$ M, în tampon fosfaţi m/10, pH 7,4. Limitele de potenţial folosite erau de —0,5 V pînă la —1,6 V, corespunzătoare curentului limită de reducere a oxigenului şi a apei oxigenate. Se adaugă apoi soluţia de catalază în concentraţia dorită şi se lasă 10 min, după care se înregistrează polarograma respectivă. Determinările s-au făcut cu polarograful Heyrovsky, model V-301.

Rezultate obţinute. Catalaza hepatică de cal. În figura 3 se reprezintă polarograma soluţiei de catalază înainte şi după iradiere.

Precizăm că prima treaptă, corespunzătoare potenţialului circa —0,5 V, reprezintă valoarea curentului limită de reducere a oxigenului. În urma adăugării de catalază, această valoare sporeşte apreciabil, datorită activării oxigenului din complexul I (scris prescurtat Cat. H_2O_2.I). Valoarea curentului limită variază invers cu concentraţia în catalază. Treapta a doua de reducere a apei oxigenate scade, deoarece o parte din peroxidul de hidrogen al substratului este descompus prin acceptarea electronilor de către compusul Cat. H_2O_2.I. În urma iradierii valoarea curentului limită scade, ceea ce demonstrează că structura moleculară a catalazei se modifică, activitatea complexului I micşorîndu-se. Asemănător

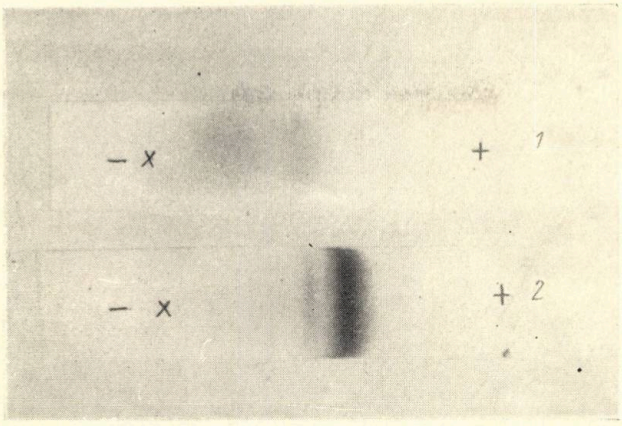


Fig. 1. — Electroforegrama catalazei cristalizate. Soluție tampon veronal pH 8,6 ; $\mu = 0,05$; 6 V/cm ; 1,5 mA/bandă ; durata 8 ore.

1 — Ficat de pore ; *2* — ficat de cal.

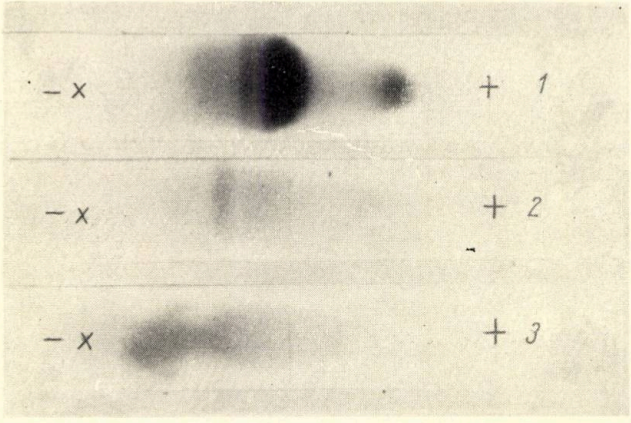


Fig. 2. — Electroforegrama catalazei eritrocitare de cal.

1 — Soluție de catalază cu activitatea 400 ($K_V \cdot 10^4$) ; *2* — aceeași soluție după două agitări cu amestec alcool : cloroform, 1 : 1 ; 3 — eluatul soluție tampon fosfați pH 7.4 al adsorbatului pe fosfat tricalcic (din *2*).

se comportă și catalaza hepatică de porc și pasăre (găină), după cum se vede în figurile 4 și 5.

Diferența de înălțime a treptelor catalitice se datorește unei concentrații mai mici a soluțiilor enzimatice.

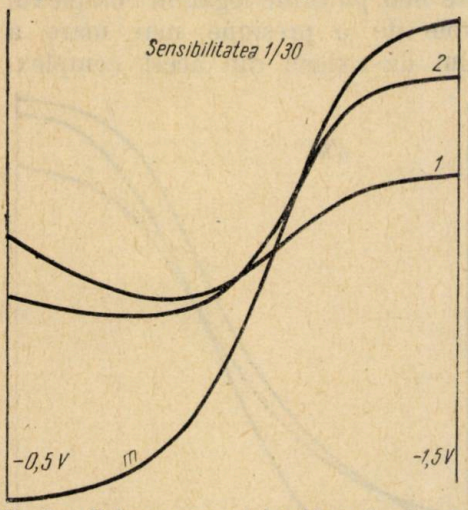


Fig. 3. — Polarograma catalazei hepatice de cal. *m* — Polarograma martor, soluție de H_2O_2, de concentrație $8{,}8.10^{-4}$ M; *1* — după adăugarea catalazei, înainte de iradiere; *2* — aceeași soluție după iradiere timp de 30 min. Menționăm că în toate determinările polarografice concentrația finală a catalazei în soluția suport (soluția tampon fosfați cu peroxid de hidrogen) era de circa 1/2000 din cea inițială.

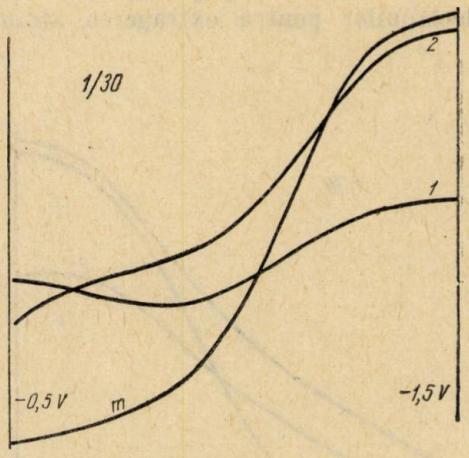


Fig. 4. — Polarograma catalazei hepatice de porc. *m* — Polarograma martor; *1* — după adăugarea catalazei, înainte de iradiere; *2* — aceeași soluție după iradiere timp de 30 min.

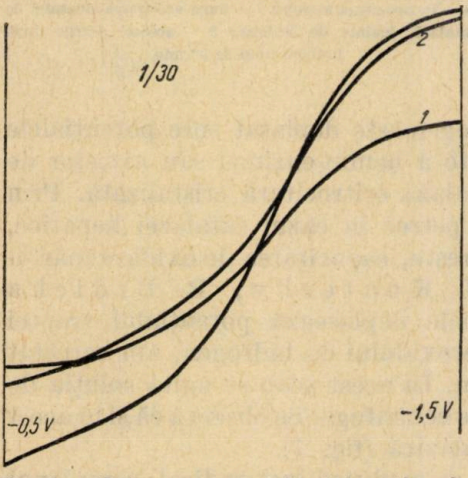


Fig. 5. — Polarograma catalazei hepatice de pasăre. *m* — Polarograma martor; *1* — după adăugarea catalazei, înainte de iradiere; *2* — aceeași soluție după iradiere timp de 30 min.

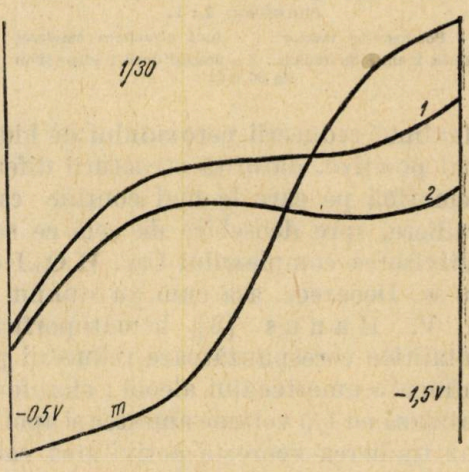


Fig. 6. — Polarograma catalazei eritrocitare de cal. *m* — Polarograma martor; *1* — după adăugarea catalazei, înainte de iradiere; *2* — aceeași soluție după iradiere timp de 30 min.

Catalaza eritrocitară de cal. Aspectul polarogramei este diferit în acest caz de acela al catalazei hepatice, aşa cum se vede din figura 6.

Potenţialul limită de reducere a oxigenului este mai negativ, ceea ce denotă că peroxidul de hidrogen este mai puternic legat în complexul peroxidic (Cat. H_2O_2.I) şi este nevoie de o presiune mai mare a electronilor pentru extragerea atomului de oxigen din acest complex.

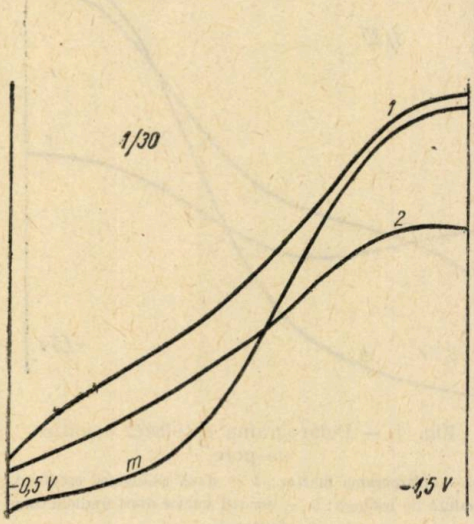


Fig. 7. — Polarograma catalazei eritrocitare de cal după agitare cu amestecul alcool : cloroform 1 : 1.

m — Polarograma martor; *1* — după adăugarea catalazei tratate, înainte de iradiere; *2* — aceeaşi după iradiere timp de 30 min.

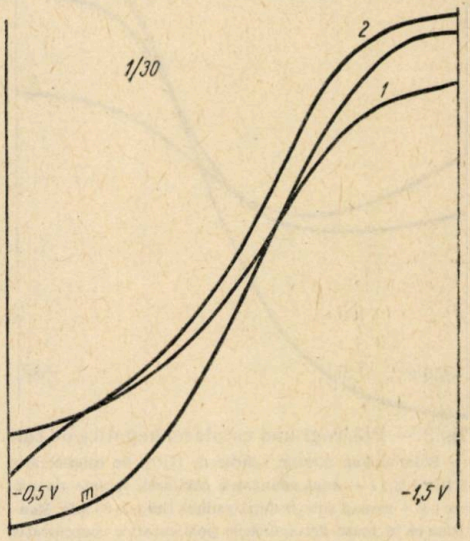


Fig. 8. — Polarograma eluatului de fosfat tricalcic.

m — Polarograma martor; *1* — după adăugarea eluatului de catalază, înainte de iradiere; *2* — aceeaşi soluţie după iradiere timp de 30 min.

Maximul reducerii peroxidului de hidrogen este deplasat spre potenţialele mai pozitive, datorită structurii diferite a hemin-enzimei sau urmelor de hematină pe care le mai conţine catalaza eritrocitară cristalizată. Prin iradiere, spre deosebire de cele ce se petrec în cazul catalazei hepatice, activitatea complexului Cat. H_2O_2.I creşte, capacitatea de oxidare mărindu-se. Deoarece, aşa cum au stabilit J. Kontecky, R. Brdicka şi V. Hanus [8], hematoporfirinele deplasează potenţialul treptei catalitice corespunzătoare reducerii peroxidului de hidrogen, am cercetat influenţa amestecului alcool : cloroform. În acest scop se agita soluţia de catalază cu 1/5 volume amestec şi apoi se centrifuga. Se observă că şi în acest caz iradierea sporeşte activitatea catalazică (fig. 7).

Polarograma catalazei neiradiate se modifică însă radical, complexul Cat. H_2O_2.I căpătînd un caracter net peroxidic, insensibil la acţiunea peroxidului de hidrogen. Acest caracter apare şi mai net după purificare prin absorbţie pe gel de fosfat tricalcic (fig. 8) şi iradiere.

DISCUȚII

Metoda polarografică a fost folosită pentru a lămuri modul de acțiune al catalazei de către K. Wiesner [14] și V. Hanus [6]. Stabilitatea complexului monodentat Cat. H_2O_2.I și capacitatea sa de acceptor de electroni determină potențialul și intensitatea curentului limită al celor două trepte catalitice.

Formarea complexului coordinativ Cat.Fe^{3+}.H_2O_2.I (scris astfel pentru a se pune mai bine în evidență legătura coordinativă dintre metal și ligand) modifică starea moleculei de H_2O_2, permițînd extragerea a 2 electroni de la o altă moleculă de peroxid de hidrogen [15]. Starea electronică a complexului peroxidic diferențiază comportarea față de donorul de hidrogen, barierele cinetice și sterice cooperînd cu factorii termodinamici pentru a stabili specificitatea enzimei (catalază sau peroxidază). Tehnica polarografică utilizată în prezenta lucrare dă indicații cu privire la reactivitatea complexului peroxidic. În cazul catalazei hepatice capacitatea de oxidare a acesteia este mai mare decît în cazul catalazei eritrocitare (valoarea curentului limită de reducere a oxigenului este mai mare).

Prin iradiere se vede că această capacitate este simțitor redusă, ceea ce denotă că s-a produs o deformare a edificiului electronic al grupei heminice și mai ales a inelului rezonant al porfirinei. Acest fapt este confirmat și de scăderea curentului limită de reducere al peroxidului de hidrogen. Capacitatea de acceptare a electronilor este micșorată (înălțimea curbei *2* din figura 3 este mai mare la potențialul −1,5 V).

În cazul catalazei eritrocitare structura electronică a complexului peroxidic (Cat. H_2O_2.I) diferă. Potențialul de reducere al oxigenului este deplasat spre dreapta, ceea ce demonstrează că legătura dintre fierul heminic și ligandul-peroxid este de alt ordin de mărime. Prin iradiere modificarea produsă este de sens invers față de aceea din cazul catalazei hepatice, producîndu-se o activare. Trebuie subliniat că tratamentul cu amestec alcool : cloroform și adsorbția pe gel de fosfat tricalcic schimbă modul de comportare al catalazei eritrocitare. Este semnificativă în acest caz comportarea complexului Cat. H_2O_2.I care nu mai poate reduce peroxidul de hidrogen (fig. 8, curba *1*), legăturile coordinative formate nepermițînd extragerea electronilor.

Catalaza a căpătat în acest caz caracter de peroxidază. Iradierea produce și în acest caz o activare și revenirea parțială la caracterul catalazic. Comportarea diferită a catalazei de origine eritrocitară față de cea hepatică a fost semnalată și în alt mod de E. Margoliash și H. Schejte [11], în cazul acțiunii 3-amino-1, 2, 4-triazolului. Autorii explică rezistența catalazei eritrocitare la acțiunea inhibitoare a 3-amino-1, 2, 4-triazolului prin existența unui compus sulfhidrilat dializabil care servește ca donor de hidrogen pentru complexul Cat. H_2O_2.I. Se evidențiază și în acest caz formarea unor complecși catalazici diferiți, după originea catalazei și a liganzilor prezenți. Formarea unui complex catalazic cu substanțele bogate în electroni neparticipanți a fost semnalată și de D. N. Isăcescu, D. Ștefănescu și V. Ursu [7] care pun în evidență formarea complexului Cat.H_2O_2.benzidină.

Rezultatele experienţelor întreprinse arată că metoda polarografică constituie un mijloc adecvat de cercetare a complecşilor catalazici activi cît şi a factorilor care determină modul lor de comportare. Se scoate de asemenea în relief importanţa structurii electronice a heminenzimelor asupra activităţii şi specificităţii lor. Acest fapt explică sensibilitatea acestei categorii de enzime la acţiunea radiaţiilor, deşi nu necesită activatori tiolici.

CONCLUZII

1) Analiza polarografică a preparatelor catalazice în soluţii suport de peroxid de hidrogen dă indicaţii cu privire la natura şi activitatea complecşilor peroxidici de tipul Cat. H_2O_2.

2) Din interpretarea datelor polarografice rezultă că există diferiţi complecşi, după originea catalazei. Deosebirile dintre aceştia se pot explica prin diferenţa de structură electronică a hemoproteinei respective, adică prin felul cum sînt distribuiţi electronii între fier şi inelul porfirinic.

3) În urma iradierii cu radiaţii gamma de mică intensitate, această structură se modifică, ceea ce poate fi pus în evidenţă în mod precis cu ajutorul metodei polarografice.

4) Catalaza de origine hepatică este inhibată prin iradiere în condiţiile în care s-a experimentat, pe cînd catalaza eritrocitară este activată.

5) Există posibilitatea ca prin anumite tratamente chimice să poată fi disociate cele două caractere diferite ale catalazei : peroxidazic şi catalazic propriu-zis.

Prezentată la redacţie
la 6 august 1962

Catedra de chimie biologică, Facultatea de medicină veterinară, Bucureşti

ЭФФЕКТ, ОКАЗЫВАЕМЫЙ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯМИ (^{60}Co) НА КАТАЛАЗУ

РЕЗЮМЕ

Авторы применили соответствующий полярографический метод для изучения каталазной активности и влияния, оказываемого малоинтенсивными гамма-излучениями этого фермента. Было констатировано, что действие энергетических излучений изменяется с происхождением каталазы. В то время как печеночная каталаза ингибируется, эритроцитарная — активируется. Это можно объяснить различным строением соответствующих гемин-энзимов, что подробно рассматривается в работе.

Полярографический метод применим для изучения комплексных соединений каталазы и может выявить влияние, оказываемое некоторыми физико-химическими способами обработки на поведение этих соединений.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Электрофореграмма кристаллической каталазы. Буфер веронал, pH = 8,6; $\mu = 0{,}05$; 6 в/см; 1,5 мА/полосу; продолжительность 8 часов.

Рис. 2. — Электрофореграмма эритроцитной каталазы лошади. *1* — Раствор каталазы с активностью 400 ($K_V \cdot 10^4$); *2* — тот же раствор после двукратного перемешивания со смесью спирта и хлороформа (1:1); *3* — элюат буферным раствором (pH = 7,4) адсорбента на $Ca_3(PO_4)_2$.

Рис. 3. — Полярограмма печеночной каталазы лошади. *m* — контрольная полярограмма, $8{,}8 \cdot 10^{-4}$ М. раствор H_2O_2; *1* — после добавления каталазы, до облучения; *2* — тот же раствор, после облучения 30 мин.

Следует отметить, что для всех полярографических определений конечная концентрация каталазы в буферном растворе H_2O_2 составляла примерно 1/2 000 по отношению к начальной.

Рис. 4. — Полярограмма печеночной каталазы свиньи. *m* — контрольная полярограмма; *1* — после добавления каталазы, до облучения; *2* — тот же раствор после облучения 30 мин.

Рис. 5. — Полярограмма печеночной каталазы птиц. *m* — контрольная полярограмма; *1* — после добавления каталазы, до облучения; *2* — тот же раствор после облучения 30 мин.

Рис. 6. — Полярограмма эритроцитной каталазы лошади. *m* — контрольная полярограмма; *1* — после добавления каталазы, до облучения; *2* — тот же раствор после облучения 30 мин.

Рис. 7. — Полярограмма эритроцитной каталазы лошади после перемешивания со смесью спирта с хлороформом (1:1).

m — контрольная полярограмма: *1* —после добавления обработанной каталазы, до облучения; *2* — то же после облучения 30 мин.

Рис. 8. — Полярограмма элюата $Ca_3(PO_4)_2$. *m* — контрольная полярограмма; *1* — после добавления элюата каталазы, до облучения; *2* — тот же раствор после облучения 30 мин.

EFFET DES RADIATIONS GAMMA (^{60}Co) SUR LA CATALASE

RÉSUMÉ

On utilise une technique polarographique adéquate pour étudier l'activité de la catalase et l'influence des radiations gamma de faible intensité sur cette enzyme. On constate que l'action des radiations énergétiques varie avec l'origine de la catalase. Tandis que la catalase hépatique est inhibée, la catalase érythrocytaire est activée par ce traitement. Cela pourrait être expliqué par la structure électronique différente des hémine-enzymes respectives. Le problème est discuté.

La méthode polarographique est très indiquée pour l'étude de la catalase et elle peut mettre en évidence l'effet de certains traitements physico-chimiques sur leur comportement.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Electrophorégramme de la catalase crystallisée. Solution tampon véronal pH 8,6 ; $\mu = 0{,}05$; 6 V/cm ; 1,5 mA/bande ; durée 8 heures.

1 — Foie de porc ; *2* — foie de cheval.

Fig. 2. — Electrophorégramme de la catalase érythrocytaire de cheval.

1 — Solution de catalase à l'activité 400 ($K_V.10^4$) ; *2* — la même solution après deux agitations avec un mélange alcool : chloroforme 1 : 1 ; *3* — l'éluat à une solution tampon de phosphates pH 7,4 de l'adsorbé sur phosphate tricalcique (cité en [2]).

Fig. 3. — Polarogramme de la catalase hépatique de cheval.

m — Polarogramme-témoin, solution d'eau oxygénée à la teneur de $8{,}8.10^{-4}$ M ; *1* — polarogramme après addition de la catalase et avant l'irradiation ; *2* — la même solution après 30 minutes d'irradiation.

Nous mentionnons que dans toutes les déterminations polarographiques la concentration finale de la catalase dans la solution-support (la solution tampon : phosphates avec péroxyde d'hydrogène) était d'environ 1/2 000 de sa valeur initiale.

Fig. 4. — Polarogramme de la catalase hépatique de porc.

m — Polarogramme-témoin ; *1* — polarogramme après addition de la catalase et avant l'irradiation ; *2* — la même solution après 30 minutes d'irradiation.

Fig. 5. — Polarogramme de la catalase hépatique d'oiseau.

m — Polarogramme-témoin ; *1* — polarogramme après addition de la catalase et avant l'irradiation ; *2* — la même solution après 30 minutes d'irradiation.

Fig. 6. — Polarogramme de la catalase érythrocytaire de cheval.

m — Polarogramme-témoin ; *1* — polarogramme après addition de la catalase et avant l'irradiation ; *2* — la même solution après 30 minutes d'irradiation.

Fig. 7. — Polarogramme de la catalase érythrocytaire de cheval après agitation avec le mélange alcool : chloroforme 1 : 1.

m — Polarogramme-témoin ; *1* — polarogramme après addition de la catalase traitée et avant l'irradiation ; *2* — la même solution après 30 minutes d'irradiation.

Fig. 8. — Polarogramme de l'éluat de phosphate tricalcique.

m — Polarogramme-témoin ; *1* — polarogramme après addition de l'éluat de catalase et avant l'irradiation ; *2* — la même solution après 30 minutes d'irradiation.

BIBLIOGRAFIE

1. AEBI H., HEININGER J. P., SUTER H., *Methaemoglobinbildung durch Röntgenstrahlen in normalen und Katalasefreien Erythrocyten des Menschen.* Experientia, **18/3**, 129 (1962).
2. BREZINA M., ZUMAN P., *Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie.* Akad. Verlagsges., Leipzig, 1956.
3. BURUIANĂ L. M., PAVLU V., *L'étude polarographique de l'effet des radiations ionisantes sur les solutions de protéines.* Naturwiss. **46**, *13*, 426 (1959).
4. БУРУЯНА Л. М., ПАВЛУ В., *Полярографически анализ растворов белков подвергшихся действию ионизирующей радиации слабой интенсивности.* Биохимия, **25**, *4*, 593 (1960).
5. FALLAB S., ERLENMEYER H. E., *Zur Wirkungsweise einiger Katalase Inhibitoren.* Experientia, **16**, *2*, 59 (1960).
6. HANUS V., *Dissertation.* Polarographie Institut of Czechos. Acad. of Sci. Prague, 1955, citat în K. WIESNER, vezi [14].
7. ISĂCESCU D. N., ŞTEFĂNESCU D., URSU V., *Acţiunea oxidazică şi peroxidazică. VII. Studiul complexului catalază, hemină, sau sulfat feros cu benzidina în prezenţa apei oxigenate, prin infraroşu, izotopi radioactivi şi microscopia electronică.* Studii şi cercetări de chimie, **8**, *3*, 419 (1960).
8. KOUTECKY J., BRDICKA R., HANUS V., *Evaluation of the rate constant of the decomposition of hydrogen peroxide by catalase from the polarographic limiting current of oxygen.* Coll. of Czechoslovak Chem. Comm., **18**, 611 (1953).
9. ЛУЧИНИК И. В., ТИМОФЕЕВА - РЕСОВСКАЯ Е. А., *Влияние цианистого калия на смертности облученых животных.* Докл. Акад. наук СССР, **116**, *3*, 407 (1957).

10. МАНОЙЛОВ С. Е., ЧАМИН Н. Н., ДОБРЫНИНА Т. И., ВОСКОБОЙНИКОВ Г. В., *Выделение из эритроцитов лошади кристаллической каталазы и изучение её некоторых физико-химических свойств.* Биохимия, **26**, *3*, 408 (1961).
11. MARGOLIASH, SCHEJTER H., *Irreversible inhibition of catalase by the 3-amino-1, 2, 4-triazole* (AT) *group of inhibitors in the presence of catalase donors*, în *Haematin Enzymes*, Ed. by J. E. FALK, R. LEMBERG and R. K. MORTON, Pergamon Press, **19/1**, 233 (1961).
12. SARKAR N. K., SUMNER J, B., în *Methods in Enzymology*, Ed. by S. P. COLLOWICK and N. O. KAPLAN, Ed. Acad. Press, **II**, 775, 1955.
13. СМИРНОВА О. И., *Влияние полиаминов на каталазную активность крови облученых животных.* Радиобиология, **II**. *3*, 378 (1962).
14. WIESNER K., *The reaction mechanism of catalase.* Experientia, **18**, *3*, 115 (1962).
15. WINFIELD M. E., *Catalase oxidation mechanism*, în *Haematin Enzymes*, Ed. by J. E. FALK, R. LEMBERG and R. K. MORTON, Pergamon Press, **19/1**, 245, 1961.

METODĂ PENTRU STUDIUL VARIAȚIILOR CONTINGENTE ALE NEVOII DE AZOT *)

DE

M. D. MEZINCESCU, A. POPESCU-ȘTEFĂNESCU, E. CRISTEA și I. DINU

La șobolan, concentrația xantinoxidazei hepatice scade cînd rația cuprinde cantități insuficiente de proteine [8], [12], [18]. În general, variațiile cantitative și calitative ale aportului proteic determină variații paralele ale activității xantinoxidazei hepatice [19], [20]. Între anumite limite, aceasta este cvasi-proporțională cu gradul de acoperire a nevoii de azot [13], [17].

Această dependență a fost folosită pentru numeroase cercetări privind nutriția azotată; printre altele: cercetări asupra valorii biologice a proteinelor [5], asupra digestibilității fracțiunii proteice a alimentelor [6], asupra disponibilității aminoacizilor indispensabili din rație [7], [21] și asupra acțiunii analogilor unor aminoacizi naturali [22]. Toate aceste lucrări sînt bazate pe compararea activităților xantinoxidazice aflate la animale hrănite cu rații azotate deosebite, însă care din alte puncte de vedere se aflau în aceleași condiții.

Relația dintre gradul de acoperire a nevoii azotate și concentrația xantinoxidazei hepatice pare susceptibilă și de o altă aplicație, tot atît de utilă: ea poate fi folosită pentru studiul acțiunii factorilor contingenți care contribuie la determinarea nivelului nevoii de azot: travaliul muscular, temperatura mediului sau a corpului, compoziția rației ternare etc. O nouă metodă pentru studiul problemelor de acest gen pare cu atît mai necesară cu cît unele dintre ele au dat loc la controverse care persistă de multă vreme. Ne gîndim în special la influența travaliului, care a fost studiată mult prin fiecare din cele două metode clasice (a ponderilor și a bilanțurilor) și care nu este totuși elucidată, fără îndoială din cauza inconvenientelor acestor metode [9].

Am presupus că influența factorilor pe care i-am menționat ar putea să fie recunoscută și evaluată cu ajutorul unor experiențe de felul următor:

*) Comunicări preliminare privind rezultate parțiale s-au publicat anterior [10], [11].

(a) se provoacă depleția xantinoxidazei hepatice la un grup omogen de animale, prin administrarea unei alimentații sărace în proteine; (b) într-o perioadă următoare („perioada experimentală") animalele sînt împărțite în două loturi și primesc o rație care, deși suboptimală, este totuși deajuns de bogată în proteine pentru ca să poată permite o creștere considerabilă a activității xantinoxidazei hepatice; (c) unul dintre loturi servește drept martor iar celălalt („lotul experimental") este supus acțiunii factorului care urmează să fie cercetat din punctul de vedere al influenței pe care o are asupra nevoii de azot. Dacă acest factor ar crește nevoia, animalele lotului experimental ar trebui să prezinte un deficit mai mare de azot; prin urmare, la aceste animale concentrația xantinoxidazei hepatice ar trebui să crească în măsură mai mică și mai încet decît la animalele din lotul martor; dimpotrivă, dacă factorul considerat ar determina scăderea nevoii de azot, activitatea xantinoxidazică ar crește mai repede.

Pentru ca să verificăm validitatea acestei metode, era necesar s-o aplicăm într-un caz de variație indubitabilă a nevoii de azot, determinată de un factor contingent care să nu constea într-o modificare a rației proteice. O asemenea variație a fost semnalată și studiată de D. P. Cuthbertson, H. N. Munro, E. Geiger și colaboratori [1], [3], [4], [14]. Acești autori au arătat că dacă șobolanul ingerează proteinele din rație separat, la interval de cîteva ore (3—5 ore) înainte sau după ingerarea glucidelor, nevoia de azot crește deoarece utilizarea metabolică a proteinelor este defectuoasă. Scăderea utilizării proteinelor este demonstrată de curbele de creștere și de valorile bilanțurilor azotate. Animalele care consumă proteinele separat rețin mai puțin azot și cresc mai încet. Cum acest efect al administrării separate a proteinelor era foarte potrivit pentru verificarea care ne interesa, în lucrarea de față am reluat experiențele lui Munro și ale lui Geiger, folosind simultan, pentru recunoașterea creșterii nevoii azotate, metoda ponderilor și metoda propusă de noi.

TEHNICA

Am făcut o primă serie de trei experiențe potrivit schemei descrisă mai sus, folosind pentru determinarea activității xantinoxidazice metoda propusă de Figge și Strong. Aceasta constă în măsurarea timpului necesar pentru reducerea (în tuburi Thunberg) a 1,13 μM albastru de metilei de către enzima cuprinsă în 0,5 g țesut hepatic, în prezență de hipoxantină. Activitățile enzimatice au fost caracterizate cu ajutorul valorilor reciproce ale timpului de decolorare; de fapt, s-au folosit valorile:

$$\frac{1 \times 10^3}{\text{timp (în secunde) necesar pentru 90\% reducere}}.$$

Într-o a doua serie de trei experiențe, am folosit pentru determinarea activității xantinoxidazice o metodă introdusă recent de G. G. Villela [16], care se bazează pe reducerea clorurii de trifeniltetrazoliu la clorură de trifenilformazan de către xantinoxidaza hepatică, în prezență de xantină. Activitățile xantinoxidazice au fost exprimate în unități de enzimă

conținute în 1 mg țesut uscat. O unitate xantinoxidazică (U.X.O.) este cantitatea de enzimă care, în condițiile încercărilor [16], la 37°C și în 30 min, catalizează producerea de 1 μg formazan.

Rezultatele obținute în a doua serie de experiențe, deși în esență similare cu cele obținute în prima serie, sînt mai semnificative, sub anumite aspecte. În primul rînd, compararea activităților xantinoxidazice apare mai legitimă cînd ele sînt exprimate în unități enzimatice bine definite, decît atunci cînd activitățile sînt caracterizate cu ajutorul valorilor reciproce ale timpurilor de decolorare. Pe de altă parte, de la o serie la alta, am introdus unele ameliorări în conducerea generală a experiențelor. În linii mari, dispozitivul experimental a rămas însă același în toate cazurile. Îndeosebi: (a) am folosit totdeauna pui de șobolani înțărcați de curînd (în vîrstă de 21—35 zile); (b) înaintea fiecărei experiențe (în perioada de depleție proteică) animalele au fost hrănite timp de 5 zile cu o rație cuprinzînd 6% cazeină; (c) în cursul experiențelor animalele au fost hrănite potrivit tehnicii *paired-feeding*-ului, așa cum se arată mai departe; în sfîrșit (d) în toate experiențele am cîntărit regulat animalele (la 3—4 zile) și am stabilit curbele de creștere corespunzătoare.

Pentru precizarea modului general de lucru, descriem prima experiență din a doua serie (exp. *IV*). În principiu, toate celelalte experiențe au decurs la fel. Diverse particularități prezentate de una sau alta dintre ele vor fi menționate ulterior.

În experiența *IV* s-au folosit 16 pui de șobolani în vîrstă de 21 de zile ținuți în cuști individuale. Animalele au fost hrănite timp de 5 zile cu o rație săracă în proteine, conținînd 6% cazeină. La sfîrșitul acestui interval s-au sacrificat 6 animale (prin decapitare) și s-a determinat activitatea xantinoxidazei hepatice la fiecare animal. Media rezultatelor a fost socotită drept activitate inițială (la timpul *zero* al experienței propriu-zise) pentru toate celelalte 10 animale rămase. Acestea au fost împărțite în două loturi egale (lotul experimental și lotul martor); animalele au fost astfel alese încît fiecare șobolan dintr-un lot să poată fi „împerecheat" cu un șobolan din lotul al doilea, avînd același sex și greutate apropiată. Rația cu care au fost hrănite animalele a cuprins următoarele produse: *amidon* 64 p. 100, *untdelemn* 10 p. 100, *amestec salin* *) 4 p. 100, *agar-agar* 2 p. 100 și *vitamine* **), constituind împreună „fracțiunea neproteică, și *proteine* ***) 20 p. 100.

Șobolanilor din lotul experimental li se ofereau zilnic cantități cîntărite, depășind regulat consumul, din fracțiunea neproteică. Animalele se

*) După Terroine și Reichert [15], conținînd NaCl 11,6; KCl 10,4; HK_2PO_4 23,2; $HNaCO_3$ 2,9; K_2SO_4 1,8; citrat de Mg $(Mg_3(C_6H_5O_7)_2 \cdot 14\ H_2O)$ 9,4; citrat de Ca $(Ca_3(C_6H_5O_7)_2 \cdot 2\ H_2O)$ 34,8; și citrat de Fe $(FeC_6H_5O_7 \cdot 3H_2O)$ 5,8 părți pentru 100; cu un supliment de 0,212 mg Na_2MoO_4 pentru 100 g amestec.

**) Clorhidrat de tiamină 12 mg, riboflavină 20 mg, piridoxină 12 mg, nicotinamidă 25 mg, biotină 2 mg, inozitol 250 mg, acid folic 3 mg, acid *p*-aminobenzoic 300 mg, pantotenat de Ca 50 mg, clorhidrat de colină 2 500 mg, vitamina A 100 000 U.I., vitamina D_2 20 000 U.I., vitamina K 2,5 mg și vitamina E 22 mg, pentru 1 kg rație neproteică.

***) Cazeină 87, drojdie de bere uscată (la 100°C) 10, și metionină 3 părți pentru 100 părți de amestec.

hrăneau *ad libitum* cu această fracțiune din rație, între orele 17 și 7 (a doua zi), cînd resturile de hrană neconsumată erau îndepărtate din cuști și se cîntăreau. Se stabilea astfel cantitatea de alimente neproteice consumată zilnic de fiecare animal. La ora 11, adică după 4 ore de la îndepărtarea fracțiunii neproteice, se ofereau animalelor și proteinele din rație, în proporție de 25 p. 100 din fracțiunea neproteică pe care a consumat-o fiecare. În principiu, proteinele rămîneau la dispoziția animalelor timp de 2 ore; însă în general ele erau consumate în totalitate mult mai curînd. În fine, după un al doilea interval de 4 ore, se relua alimentația *ad libitum* cu fracțiunea neproteică.

Șobolanii din lotul martor au consumat zilnic cantități bine determinate din rația completă, care conținea proteinele și fracțiunea neproteică împreună. Ei au fost puși la regim cu 18 ore mai tîrziu decît cei din lotul experimental. Cantitatea de hrană oferită fiecărui animal, care a fost totdeauna consumată integral, s-a stabilit ținîndu-se seama (*a*) de cantitatea de hrană consumată în ajun de către șobolanul pereche din lotul experimental și (*b*) de greutățile ambelor animale, astfel încît șobolanii dintr-o aceeași pereche să ingereze pe unitatea de greutate corporală aceleași cantități din fiecare principiu alimentar*) în tot cursul experienței. Un sfert din rație a fost introdus în cușcă la ora 11 iar restul la ora 17.

Fiecare animal a fost cîntărit la începutul perioadei experimentale și apoi regulat, la interval de 3—4 zile.

După 21 de zile de regim toate animalele au fost sacrificate și s-a determinat la fiecare activitatea xantinoxidazică a ficatului.

Celelalte două experiențe din seria a doua (experiențele *V* și *VI*) s-au deosebit de experiența descrisă mai sus numai prin faptul că pentru una din ele s-au folosit șobolani în vîrstă de 35 de zile, (în loc de 21 de zile), iar cealaltă a durat 28 de zile (în loc de 21 de zile).

Pentru experiențele din prima serie, în care determinările de activitate xantinoxidazică s-au făcut cu metoda Figge-Strong, s-au folosit totdeauna șobolani în vîrstă de 35 de zile iar animalele au fost hrănite cu o rație care avea compoziția următoare: *glucide* (glucoză și amidon) 46 p. 100; *lipide* (untdelemn) 25 p. 100, *amestec salin***) 3 p. 100; *agar-agar* 3 p. 100 și *vitamine***), constituind împreună „fracțiunea neproteică", și *proteine***) 23 p. 100. Pe de altă parte, determinările de activitate xantinoxidazică s-au făcut totdeauna pe omogenate de ficat provenind de la cîte 3—4 șobolani din același lot. În fine, în ultima experiență din această serie (experiența *III*) s-a inclus și un lot de șobolani hrăniți cu o rație care cuprindea un surplus de proteine — 31% în loc de 23% — și mai puțin glucide (numai 38%). La aceste animale (din experiența *III*) s-au stabilit și bilanțurile azotate, în ultimile două săptămîni ale perioadei experimentale.

*) Uneori, de fapt foarte rar, un șobolan din lotul martor nu consuma complet proteinele corespunzătoare consumului său de alimente ternare — el ingera, spre exemplu, o cantitate reprezentînd numai 16 p. 100 din rația neproteică, în loc de 20 p. 100. În asemenea cazuri martorul primea o „rație completă" cuprinzînd aceeași proporție de proteine.

**) Vezi notele de subsol de la p. 529.

REZULTATE

Rezultatele experiențelor *I*, *II* și *III* (din prima serie) sînt prezentate grafic în figurile 1, 2 și 3. Pentru fiecare experiență se dau curbele mijlocii de creștere ale celor două (sau trei) loturi de șobolani și, sub formă de histograme, activitățile xantinoxidazice mijlocii. În figura 3 se mai dau, sub formă de histogramă, și bilanțurile azotate mijlocii determinate pentru cele trei loturi. Rezultatele experiențelor *IV*, *V* și *VI* (variațiile

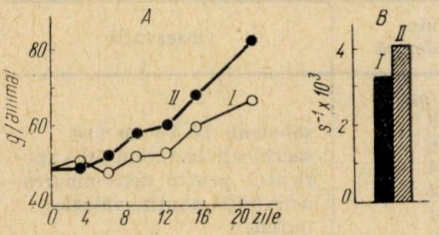


Fig. 1. — Rezultatele experienței *I*.

A : Variația greutății mijlocii a șobolanilor din lotul experimental (curba *I*) și a celor din lotul martor (curba *II*). *B* : Activitățile xantinoxidazice mijlocii determinate la șobolanii din lotul experimental (coloana I) și la șobolanii din lotul martor (coloana II).

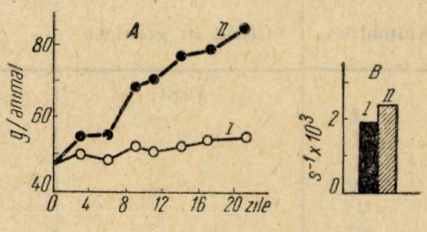


Fig. 2. — Rezultatele experienței *II*.

A : Variația greutății mijlocii a șobolanilor din lotul experimental (curba *I*) și a celor din lotul martor (curba *II*). *B* : Activitățile xantinoxidazice mijlocii determinate la șobolanii din lotul experimental (coloana I) și la șobolanii din lotul martor (coloana II).

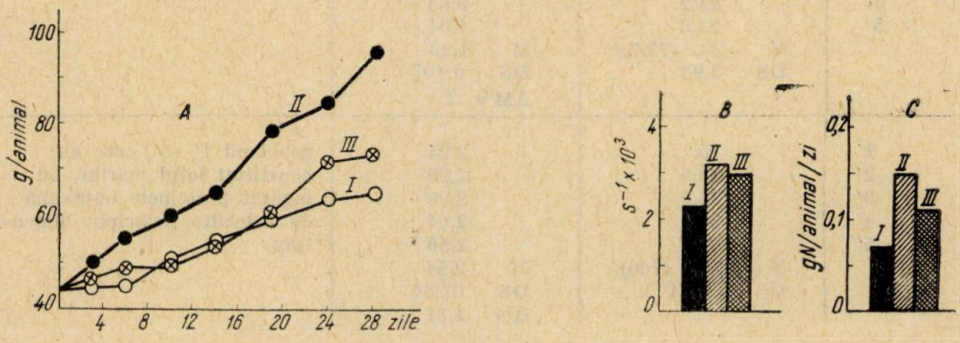


Fig. 3. — Rezultatele experienței *III*.

A : Variațiile greutății mijlocii a șobolanilor din lotul experimental (curba *I*), a șobolanilor din lotul martor (curba *II*) și a șobolanilor din lotul al 3-lea (curba III). *B* : Activitățile xantinoxidazice mijlocii determinate la șobolanii din lotul experimental (coloana I), la șobolanii din lotul martor (coloana II) și la cei din lotul al 3-lea (coloana III). *C* : Bilanțurile azotate mijlocii determinate la șobolanii din lotul experimental (coloana I), la cei din lotul martor (coloana II) și la șobolanii din lotul al 3-lea (coloana III).

greutății animalelor și activitățile xantinoxidazice ale ficatului lor) sînt consemnate în tabelele 1, 2 și 3.

Variațiile greutăților. Curbele de creștere din figuri arată imediat că animalele din loturile experimentale, care ingerau proteinele separat, au crescut mai încet decît cele din loturile martor. În *experiențele I* și *III* șobolanii din loturile experimentale au cîștigat numai jumătate din greu-

tatea cîştigată de animalele din loturile martor corespunzătoare : 17,5 g faţă de 33 g, respectiv 22,5 g faţă de 53 g (cîştiguri globale în tot cursul experienţei) ; iar în *experienţa II* cîştigurile medii în greutate au fost de 7,5 g pentru şobolanii din lotul experimental şi de 37,5 g pentru şobolanii din lotul martor. Datele din tabele, privind experienţele din seria a doua

Tabela 1

Efectul administrării separate a proteinelor asupra creşterii şi concentraţiei xantinoxidazei hepatice
Experienţa IV. Vîrsta iniţială a şobolanilor 21 de zile ; durata experienţei 21 de zile

Animal nr.	Cîştig în greutate	Activitate xantinoxidazică	Observaţii
	g/spt.	U.X.O./mg	
I	—	1,28	şobolanii I—VI au fost sacrificaţi la începutul experienţei, pentru determinarea activităţii xantinoxidazice iniţiale
II	—	1,36	
III	—	1,04	
IV	—	1,12	
V	—	1,44	
VI	—	1,12	
		M[a]) 1,23	
		DS[b]) 0,137	
1	13,2	0,84	şobolanii 1—5, care au constituit lotul experimental, au ingerat proteinele separat
2	20,5	1,76	
3	19,9	1,68	
4	24,2	0,83	
5	23,6	1,04	
	M 20,3 (75.7)[c])	M 1,23	
	DS 3,93	DS 0,407	
		ΔM[d]) ± 0	
1′	15,1	2,24	şobolanii 1′—5′, care au constituit lotul martor, au ingerat proteinele împreună cu celelalte principii alimentare
2′	33,5	2,29	
3′	27,5	2,96	
4′	30,2	2,64	
5′	27,7	2,56	
	M 26,8 (100)	M 2,54	
	DS 6,24	DS 0,250	
		ΔM 1,31	

a) M = Media.

b) DS = Deviaţia standard a distribuţiei.

c) Între paranteze sînt date valorile raportului : $\frac{\text{media} \times 100}{\text{media pentru lotul martor.}}$.

d) ΔM = Creşterea medie a activităţii xantinoxidazice, calculată admiţîndu-se că la şobolanii din grupurile 1—5 şi 1′—5′ activitatea xantinoxidazică medie la începutul experienţei a fost egală cu cea determinată la şobolanii I—VI.

(*IV*, *V* şi *VI*), arată cîştigul în greutate pentru fiecare animal. Cu o singură excepţie, toate animalele din loturile experimentale au crescut mai puţin decît animalele din loturile martor cu care erau împerecheate. Diferenţele dintre cîştigurile în greutate au fost considerabile, în special în primele două experienţe din această serie ; astfel : în *experienţa IV*, animalele din lotul experimental au crescut în medie cu 20,3 g/săptămînă, pe cînd cele din

lotul martor au crescut cu 26,8 g/spt.; iar în *experiența V* creșterile medii au fost de 19,8 g/spt. pentru animalele din lotul experimental și de 24,3 g/spt. pentru cele din lotul martor. În *experiența VI* diferența dintre cîștigurile ponderale mijlocii ale celor două serii de șobolani a fost ceva mai mică, probabil deoarece s-au folosit pui relativ mari și s-a prelungit experiența

Tabela 2

Efectul administrării separate a proteinelor asupra creșterii și concentrației xantinoxidazei hepatice
Experiența V. Vîrsta inițială a șobolanilor 35 de zile; durata experienței 21 de zile

Animal nr.	Cîștig în greutate	Activitatea xantinoxidazică	Observații
	g/spt.	U.X.O./mg	șobolanii I—III au fost sacrificați la începutul experienței pentru determinarea activității xantinoxidazice inițiale
I	—	1,40	
II	—	1,44	
III	—	1,36	
		M[a]) 1,40	
		DS[b]) 0,033	
1	20,7	1,68	șobolanii 1—5, care au constituit lotul experimental, au ingerat proteinele separat
2	19,2	1,76	
3	17,5	1,84	
4	17,3	1,76	
5	24,4	1,60	
	M 19,8 (81,6)[c])	M 1,73	
	DS 2,60	DS 0,033	
		ΔM[d]) 0,33 (35,8)	
1′	23,1	2,32	șobolanii 1′—5′, care au constituit lotul martor, au ingerat proteinele împreună cu celelalte principii alimentare
2′	29,5	2,24	
3′	20,7	2,40	
4′	23,5	2,56	
5′	24,5	2,08	
	M 24,3 (100)	M 2,32	
	DS 2,89	DS 0,16	
		ΔM 0,92 (100)	

a) M = Media.

b) DS = Deviația standard a distribuției.

c) Între paranteze sînt date valorile raportului: $\frac{\text{media} \times 100}{\text{media pentru lotul martor}}$.

d) ΔM = Creșterea medie a activității xantinoxidazice, calculată admițîndu-se că la șobolanii din grupurile 1—5 și 1′—5′ activitatea xantinoxidazică medie la începutul experienței a fost egală cu cea aflată la șobolanii I—III.

cu o săptămînă (a durat 4 săptămîni în loc de 3): animalele care au ingerat proteinele separat au crescut în medie cu 25,0 g/spt. iar cele hrănite cu rația completă au cîștigat în medie 27,5 g/spt.

Activitățile xantinoxidazice. La animalele din loturile experimentale acestea au fost totdeauna mai mici decît la animalele din loturile martor. În experiențele din prima serie (*I—III*, v. figurile) activitățile xantinoxidazice mijlocii aflate la loturile experimentale au reprezentat 70—80% din cele aflate la loturile martor corespunzătoare. În experiențele din a doua

serie (*IV—VI*, v. tabelele) diferenţele dintre activităţile xantinoxidazice au fost deosebit de mari: 1,23 faţă de 2,54 în *experienţa IV*; 1,73 faţă de 2,32 în *experienţa V*; şi 1,64 faţă de 2,66 în *experienţa VI*. Aceste valori sînt activităţi xantinoxidazice mijlocii, exprimate în unităţile definite anterior. Dacă se admite că la începutul unei experienţe animalele din

Tabela 3

Efectul administrării separate a proteinelor asupra creşterii şi concentraţiei xantinoxidazei hepatice
Experienţa VI. Vîrsta iniţială a şobolanilor 35 de zile; durata experienţei 28 de zile

Animal nr.	Cîştig în greutate	Activitatea xantinoxidazică	Observaţii
	g/spt.	U.X.O./mg	
I—V[a])	—	1,39	şobolanii I—V au fost sacrificaţi la începutul experienţei, pentru determinarea activităţii xantinoxidazice iniţiale
1	26,8	1,76	şobolanii 1—5, care au constituit lotul experimental, au ingerat proteinele separat
2	28,7	1,72	
3	16,5	1,65	
4	29,5	1,56	
5	23,5	1,52	
	M[b]) 25,0 (90,9)[d])	M 1,64	
	DS[c]) 4,73	DS 0,091	
		ΔM[e]) 0,25 (19,6)	
1′	32,0	2,96	şobolanii 1′—5′, care au constituit lotul martor au ingerat proteinele împreună cu celelalte principii alimentare
2′	28,2	2,00	
3′	18,8	2,81	
4′	32,1	2,88	
5′	26,5	2,64	
	M 27,5 (100)	M 2,66	
	DS 4,88	DS 0,345	
		ΔM 1,27 (100)	

a) Activitatea xantinoxidazică s-a determinat pe un homogenat unic cuprinzînd porţiuni egale din ficaţii tuturor animalelor.

b) M = Media.

c) DS = Deviaţia standard a distribuţiei.

d) Între paranteze sînt date valorile raportului: $\frac{\text{media} \times 100}{\text{media pentru lotul martor}}$.

e) ΔM = Creşterea medie a activităţii xantinoxidazice, calculată admiţîndu-se că la şobolanii din grupurile 1—5 şi 1′—5′ activitatea xantinoxidazică medie la începutul experienţei a fost egală cu cea aflată la şobolanii I—V.

ambele loturi au avut o aceeaşi activitate xantinoxidazică mijlocie, egală cu activitatea aflată la animalele sacrificate imediat (la timpul *zero*), se poate spune că la animalele din loturile experimentale creşterile activităţii xantinoxidazice în timpul experienţelor au fost: *nule* în *experienţa IV*, de 0,33 U.X.O., în *experienţa V*; şi de 0,25 U.X.O., în *experienţa VI*; pe cînd la şobolanii din loturile martor creşterile corespunzătoare au fost de 1,31, 0,92 şi 1,27 U.X.O.

★

Menționăm, în fine, datele — oarecum speciale — obținute în *experiența III*: (a) cu privire la lotul al 3-lea, hrănit cu un surplus de proteine administrate separat (31% din rație în loc de 23 %) și (b) cu privire la bilanțurile azotate ale animalelor.

Pentru lotul al 3-lea s-a aflat o activitate xantinoxidazică de 2,94, mult mai mare decît cea corespunzătoare lotului experimental (2,38) și aproape tot atît de mare ca aceea a lotului martor: 3,17 (valorile sînt reciprocele timpurilor de decolorare $\times 10^3$).

Bilanțurile azotate au fost stabilite în ultimele două săptămîni ale perioadei experimentale și s-au obținut următoarele valori mijlocii:

pentru animalele din lotul experimental	0,07 g N/animal	
„ „ „ „ *martor*	0,15	„
„ „ „ „ *al treilea*	0,11	„

Prin urmare, animalele din lotul martor au reținut aproximativ de două ori mai mult azot decît animalele din lotul experimental; de asemenea, au reținut considerabil mai mult azot (decît acestea din urmă) și animalele din lotul al 3-lea, hrănite cu un surplus de proteine administrate separat.

DISCUȚIE

Datele cu privire la cîștigurile în greutate, analizate mai sus, corespund în totul celor obținute de Cuthbertson, Geiger și Munro (cf. în special [3]). Prin urmare, sub acest aspect, experiențele noastre confirmă rezultatele obținute de acești autori și îndreptățesc concluziile lor, anume: că administrarea separată a proteinelor determină scăderea utilizării lor metabolice, astfel încît are drept rezultat creșterea nevoii de proteine. Faptul că avem de-a face cu o creștere a nevoii de proteine a fost demonstrat nemijlocit de experiențe în care animale hrănite cu rația separată au crescut (sau și-au refăcut țesuturile) în același ritm cu cele hrănite cu rația completă, cînd li s-au administrat cantități crescute de proteine (cf. [4]). Acest fapt este confirmat și de datele menționate mai sus, cu privire la lotul al 3-lea din *experiența III* (v. și fig. 3). Într-adevăr, deși au ingerat proteinele separat, animalele din acest lot au crescut mult mai bine și au prezentat un bilanț azotat mult mai favorabil decît cele din lotul experimental (propriu-zis), grație faptului că au consumat o cantitate mai mare de proteine.

Bineînțeles, pentru noi datele de importanță majoră sînt cele privind activitățile xantinoxidazice, fiindcă problema pe care ne-am propus-o era de a stabili dacă urmărirea variațiilor activității xantinoxidazice îngăduie să se recunoască variațiile nevoii de azot. După cum s-a văzut, administrarea separată a proteinelor a determinat o creștere a nevoii de proteine; prin urmare, ea ar fi trebuit să determine totodată o scădere a concentrației xantinoxidazei hepatice. Or, este tocmai ce s-a întîmplat în toate cazurile, fără nici o excepție; într-adevăr, la toți șobolanii din

Tabela 4

Date pentru compararea celor două metode

A. *Valori ale raporturilor:*

$$(1)\quad \frac{\text{cîştig ponderal mijlociu pentru lotul experimental} - \text{cîştig ponderal mijlociu pentru lotul martor}}{\text{cîştig ponderal mijlociu pentru lotul martor}} \times 100$$

$$(2)\quad \frac{\text{creşterea medie a activităţii X.O. pentru lotul experimental} - \text{creşterea medie a activităţii X.O. pentru lotul martor}}{\text{creşterea medie a activităţii X.O. pentru lotul martor}} \times 100$$

Experienţa *IV*	Experienţa *V*	Experienţa *VI*
%	%	%
Diferenţe între cîştigurile în greutate (raporturile (1))		
— 24	— 18	— 9
Diferenţe între creşterile activităţii X.O. (raporturile (2))		
— 100	— 63	— 80

B. *Coeficienţii de variaţie*[a] (1) ai cîştigurilor în greutate şi (2) ai activităţilor xantinoxidazice la diferitele loturi de şobolani.

Experienţa *IV*			Experienţa *V*			Experienţa *VI*		
lot I—VI	lot 1—5	lot 1—5	lot I—III	lot 1—5	lot 1—5	lot I—V	lot 1—5	lot 1—5
%	%	%	%	%	%	%	%	%
CV pentru cîştigurile în greutate								
—	19,4	23,3	—	13,1	11,9	—	18,9	17,7
CV pentru activităţile xantinoxidazice								
11,2	33,1	9,86	2,33	4,70	6,90	—	5,56	13,0

a) Coeficientul de variaţie (CV) este egal cu raportul : $\frac{\text{deviaţie standard a distribuţiei} \times 100}{\text{medie}}$.

cele șase loturi experimentale s-au găsit activități xantinoxidazice mult mai mici decît la martorii corespunzători. Este evident, prin urmare, că metoda pe care o propunem, constînd în cercetarea variațiilor concentrației xantinoxidazei hepatice prin experiențe cum sînt cele descrise, permite să se recunoască variațiile nevoii de azot cel puțin tot atît de bine ca metoda ponderilor.

De fapt, metoda noastră pare să fie mai adecvată decît metoda ponderilor — chiar și decît metoda bilanțurilor, fiindcă amîndouă conduc la rezultate în esență similare. Într-adevăr, din tabela 4*) se vede că diferențele *cîștig mijlociu în greutate pentru lotul martor — cîștig mijlociu în greutate pentru lotul experimental corespunzător* sînt mult mai mici decît diferențele similare dintre creșterile activităților xantinoxidazice. Pe de altă parte, din aceeași tabelă rezultă că coeficienții de variație pentru cîștigurile (omologe) în greutate sînt mult mai mari decît cei pentru activitățile xantinoxidazice. În aceste condiții, fără îndoială, putem să afirmăm că metoda pe care o propunem este mai sensibilă și totodată mai exactă decît cele două metode clasice.

CONCLUZII

Rezultatele experiențelor noastre arată că paralelismul care există (la șobolan) între gradul de acoperire a nevoii de azot și activitatea xantinoxidazică a ficatului poate să fie utilizat pentru studiul variațiilor contingente ale nevoii de azot, cu ajutorul dispozitivului experimental pe care îl preconizăm. Acesta permite să se cerceteze, în condiții concludente, dacă un factor despre care se presupune că ar putea influența nevoia de azot exercită vreo influență asupra concentrației xantinoxidazei hepatice. Din datele prezentate rezultă că această metodă este mai sensibilă și mai exactă decît metoda ponderilor.

Prezentată la redacție
la 21 iulie 1962

Catedra de chimie biologică I,
I.M.F., București

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ СЛУЧАЙНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПОТРЕБНОСТИ В АЗОТЕ

РЕЗЮМЕ

Ввиду того , что у крысы концентрация ксантиноксидазы в печени изменяется в прямой зависимости со степенью покрытия потребности в азоте, влияние случайных факторов на потребность азота можно установить, изучая в подходящих условиях влияние этих факторов на концентрацию энзима.

*) Pentru compararea valorii metodelor luăm în considerație rezultatele experiențelor *IV*, *V* și *VI*, căci numai activitățile xantinoxidazice obținute prin procedeul Villela sînt echivalente cu concentrațiile enzimei.

В работе описано 6 опытов, в которых одновременно изучалось — весовым методом и методом, предложенным авторами — влияние, оказываемое отдельным введением белков — через 4 часа после введения остальной части рациона — на потребность в азоте.

Оба метода приводят к тому же выводу, а именно: отдельное введение белков вызывает значительное увеличение потребности в азоте.

Полученные результаты показывают, с другой стороны, что метод, основанный на определении ксантиноксидазной активности более чувствителен и точен, чем весовой.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — *Результаты опыта I. A* — Изменения среднего веса крыс экспериментальной группы (кривая I) и крыс контрольной группы (кривая II). *B* — Средние ксантиноксидазные активности у крыс экспериментальной группы (колонка I) и у крыс контрольной группы (колонка II).

Рис. 2. — *Результаты опыта II. A* — Изменение среднего веса крыс экспериментальной группы (кривая I) и крыс контрольной группы (кривая II). *B* — Средние ксантиноксидальные активности у крыс экспериментальной группы (колонка I) и у крыс контрольной группы (колонка II).

Рис. 3. — *Результаты опыта III. A* — Изменения средней тяжести крыс экспериментальной группы (кривая I); у крыс контрольной группы (кривая II) и у крыс третьей группы (кривая III). *B* — Средние ксантиноксидазные активности у крыс экспериментальной группы (колонка I) у крыс контрольной группы (колонка II) и у крыс третьей группы (колонка III). *C* — Среднее содержание азота у крыс экспериментальной группы (колонка I), у крыс контрольной группы (колонка II) и у крыс третьей группы (колонка III).

MÉTHODE POUR L'ÉTUDE DES VARIATIONS CONTINGENTES DU BESOIN EN AZOTE

RÉSUMÉ

Etant donné que chez le Rat la concentration de la xanthinoxydase hépatique varie dans le même sens que le degré de couverture du besoin en azote, on peut reconnaître et préciser l'influence des facteurs contingents sur le niveau du besoin en azote, en étudiant, dans des conditions convenables, la manière dont ceux-ci agissent sur la concentration de l'enzyme.

On décrit 6 expériences dans lesquelles on a étudié, simultanément, par cette méthode et par la méthode des poids, l'effet de l'administration séparée des protéines (c'est-à-dire à 4 heures d'intervalle après l'administration du reste de la ration) sur le besoin en azote.

Les deux méthodes conduisent à la même conclusion : l'administration séparée des protéines provoque un accroissement considérable du besoin en azote.

Les résultats obtenus prouvent d'autre part que la méthode basée sur l'évaluation de l'activité xanthinoxydasique est plus sensible et plus précise que la méthode des poids.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — *Résultats de l'expérience I. A.* Variation du poids moyen des rats du lot expérimental (courbe *I*) et de ceux du lot témoin (courbe *II*). *B.* Activités xanthinoxydasiques moyennes des rats du lot expérimental (colonne *I*) et du lot témoin (colonne *II*).

Fig. 2.— *Résultats de l'expérience II. A.* Variation du poids moyen des rats du lot expérimental (courbe *I*) et du lot témoin (courbe *II*). *B.* Activités xanthinoxydasiques moyennes des rats du lot expérimental (colonne *I*) et du lot témoin (colonne *II*).

Fig. 3. — *Résultats de l'expérience III. A.* Variations du poids moyen des rats du lot expérimental (courbe *I*), des rats du lot témoin (courbe *II*) et des rats du 3e lot (courbe *III*). *B.* Activités xanthinoxydasiques moyennes des rats du lot expérimental (colonne *I*), du lot témoin (colonne *II*) et du 3e lot (colonne *III*). *C.* Bilans azotés moyens constatés chez les rats du lot expérimental (colonne *I*), du lot témoin (colonne *II*) et du 3e lot (colonne *III*).

BIBLIOGRAFIE

1. CUTHBERTSON D. P., Mc CUTCHEON A., MUNRO H. N., Biochem. J., **34**, 1002 (1940).
2. FIGGE F. H. J., STRONG L. C., Cancer Res., **1**, 779 (1941).
3. GEIGER E., Science, **108**, 42 (1948).
4. GEIGER E., BARCROFT R. W., HAGERTY E. A., J. Nutrition, **42**, 577 (1950).
5. LITWACK G., WILLIAMS J. N., FEIGELSON P., ELVEHJEM C. A., J. biol. Chem., **187**, 605 (1950).
6. LITWACK G., WILLIAMS J. N., FATTERPAKER J. P., CHEN L., ELVEHJEM C. A., J. Nutrition, **49**, 579 (1953).
7. LITWACK G., WILLIAMS J. N., ELVEHJEM C. A., J. biol. Chem., **201**, 261 (1953).
8. MCQUARRIE, E. B., VENOSA A. T., Science, **101**, 493 (1945).
9. MEZINCESCO M. D., Arch. int. Physiol., **45**, 84 (1937).
10. MEZINCESCU M. D., POPESCU-ȘTEFĂNESCU A., CRISTEA E., *A 2-a Sesiune științifică a Institutului de medicină și farmacie*, București, 1956, 599.
11. MEZINCESCO M.D., POPESCU-ȘTEFĂNESCU A., *Archives des Sciences Physiologiques* (sub tipar).
12. MILLER L. L., J. biol. Chem., **172** 113 (1948).
13. MILLER L. L., J. biol. Chem., **186**, 253 (1950).
14. MUNRO H. N., J. Nutrition, **39**, 375 (1949).
15. TERROINE E. F., REICHERT T., Arch. int. Physiol., **32**, 337 (1930).
16. VILLELA G. G., Rev. brasil. Biol., **14**, 455 (1954).
17. WAINIO W., EICHEL B., EICHEL H., PERSON P., ESTES F., ALLISON J. B., J. Nutrition, **49**, 465 (1953).
18. WESTERFELD W. W., RICHERT D. A., Proc. Soc., exp. Biol., N. Y., **71**, 181 (1949).
19. WESTERFELD W. W., RICHERT D. A., J. biol. Chem., **184**, 163 (1950).
20. WESTERFELD W. W., RICHERT D. A., J. biol. Chem., **192**, 35 (1951).
21. WILLIAMS J. N., ELVEHJEM C. A., J. biol. Chem., **181**, 559 (1949).
22. YOUNATHAN E., FRIEDEN E., DITTMER K., J. biol. Chem., **219**, 531 (1956).

CERCETĂRI IMUNOCHIMICE ASUPRA GERMINAȚIEI LA BOB *(VICIA FABA)*

DE

VICTOR GHEȚIE și LUCIA BUZILĂ

Proprietățile antigenice ale țesuturilor animale se schimbă constant în timpul ontogeniei. După B. F. Koniuhor [1] în țesuturile animalelor în curs de dezvoltare se disting trei tipuri de antigene, și anume : *de specie*, prezente în toate etapele de dezvoltare ; *de organ*, care apar pe măsura diferențierii țesuturilor ; *de stadiu*, prezente doar în anumite etape ale dezvoltării.

Studierea proprietăților antigenice ale țesuturilor animale în curs de dezvoltare a contribuit la înțelegerea dinamicii procesului de morfogeneză permițînd evidențierea modificărilor biochimice timpurii care preced și determină apariția structurilor morfologice. Aceste cercetări au conturat o nouă disciplină imunologică, imunoembriologia, consacrată studiului creșterii și dezvoltării celulelor și țesuturilor [2].

La plante, cercetări de acest fel nu sînt încă începute. Punctul lor de plecare îl pot constitui lucrările lui O. Moritz și H. vom Berg (citate după [3]). Utilizînd metoda Schultz-Dale, acești autori au arătat că țesutul nutritiv aflat în repaus și cel germinat prezintă deosebiri în privința conținutului în antigene și că aceste țesuturi pot fi de asemenea diferențiate față de materialul provenit din lăstari și rădăcini. Diferențierea imunochimică a organelor, semnalată în aceste lucrări mai vechi, a fost verificată recent de I. Kloz și colaboratori [4], folosind o metodă cantitativă de imunoprecipitare în mediu lichid. Aceste cercetări au arătat că organele unei specii date au caractere antigenice cu puține elemente structurale comune. Există diferențe tot atît de mari între structura antigenică a diferitelor organe aparținînd aceleiași specii, ca și între structura antigenică a aceluiași organ aparținînd unor specii diferite. În urma acestor cercetări, se poate considera că structura antigenică a unui organism vegetal nu este statică, ci se dezvoltă dinamic în cursul ontogenezei. Folosind însă mijloace

de investigație care nu permit disocierea caracterelor antigenice ale unui țesut sau organ și caracterizarea lor individuală, aceste cercetări nu au dus nici la cunoașterea tipurilor de antigene existente în organismele vegetale și nici la elucidarea legilor specifice de transformare a antigenelor în ontogeneza plantelor.

Abordarea acestor probleme prin noile mijloace imunochimice de investigație (imunoelectroforeza, difuzia în gel), ar permite extinderea cercetărilor de imunoembriologie și în domeniul plantelor. În acest scop în prima etapă a cercetărilor am urmărit cu ajutorul mijloacelor de investigație amintite, stabilirea numărului de antigene în țesutul embrionar în repaus și în germinație, precum și transformarea antigenelor în cursul proceselor morfogenetice care dau naștere frunzelor, rădăcinii și tulpinii plantelor.

Pentru experiențe am ales sămînța de bob (*Vicia faba*) alcătuită din embrion și tegument (coajă). Embrionul a fost împărțit în două părți : 1) cotiledoanele și 2) radicula, tulpinița și gemula, luate împreună*). Variația caracterelor antigenice s-a studiat pe această ultimă formațiune și tot pe ea s-a urmărit, pe măsura formării organelor, transformarea antigenelor. Determinările imunochimice s-au efectuat cu ajutorul unor antiseruri de iepure obținute prin imunizarea animalelor cu proteine din cotiledoane și din restul embrionului. Extracția proteinelor s-a făcut cu ser fiziologic, folosind un raport de 1 parte făină/10 părți extractant. Operația s-a efectuat timp de 30 min cu ajutorul unui agitator magnetic, după care extractul proteic s-a centrifugat 15 min la 11 800 g. Supernatantul limpede ce conține aproximativ 5 mg/ml proteină a fost folosit pentru imunizarea iepurilor, în asociație cu adjuvant Freund. Fiecărui animal i-au fost administrate subcutan sau intramuscular între 100—300 mg proteină subfracționată în 10—15 doze, timp de 30—45 de zile. Pentru analiza imunochimică s-au folosit numai serurile puternice, cu un titru precipitant cuprins între 0,5—1,0 mg/ml antigen. Titrurile s-au determinat prin metoda Uhlenhuth [5].

Difuzia în gel s-a făcut după metoda Ouchterlony [6], iar imunoelectroforeza s-a efectuat după metoda lui Grabar și Williams [7]. Dubla difuzie, analiza electroforetică și imunoelectroforetică s-au efectuat în tamponul borat-fostat de pH 7,6 [8]; concentrația tamponului în cuvă a fost de 0,28 M acid boric, iar în plăci de 0,085 M. S-a folosit un gel de agar 1,5%. Potențial 22,5 V/cm; intensitate 1 mA/cm; durata migrării 8—10 ore.

Colorarea plăcilor de electroforeză și imunoelectroforeză s-a făcut cu albastru de bromfenol [9], respectiv azocarmin B [10]. Determinarea cantitativă s-a făcut prin densitometrare la un integrator tip MFG-Berlin.

Identificarea liniilor de precipitare corespunzătoare diferitelor fracțiuni s-a făcut după metodele indicate de Heremans [11] și prin despecifieri, efectuate după tehnica de adsorbție a antigenului pe gel de hidroxid de aluminiu (12).

---

*) În cuprinsul articolului am întrebuințat pentru radiculă, tulpiniță și gemulă, termenul de „restul embrionului".

Extragerea antigenelor din țesuturi în vederea analizei imunochimice s-a făcut după cum urmează : făina din cotiledoane și din restul embrionului s-a extras cu tamponul borat-fosfat de pH 7,6, folosind un raport de extracție de 1 parte făină/10 părți extractant. Frunzele s-au extras cu același tampon la care s-au adăugat, după indicațiile date de R. Heitefuss și colaboratori [13], și : 1 M glucoză, 0,1 M sulfat de sodiu și 0,005 M mertiolat de sodiu ; raport de extracție 1 parte frunză/0,25 părți extractant. Tot cu acest extractant s-au obținut preparate din restul embrionului

Tabelă

Distribuția cantitativă a fracțiunilor proteice în cotiledoanele și restul embrionului de bob (*Vicia faba*)

Denumirea fracțiunilor (în ordinea mobilității lor electroforetice)	Procentul relativ al fracțiunilor în :	
	cotiledoane	restul embrionului
Prelegumina 1	3	3
Prelegumina 2	—	9
Legumina	50	23
Vicilina	24	56
Postvicilina 1	14	—
Postvicilina 2	9	9
Postvicilina 3		
Postvicilina 4		

germinat, ca și din frunzele, tulpinile și rădăcinile plantulei aflate în diferite faze ale morfogenezei. S-a folosit un raport de extracție variabil, cuprins între 1 parte material vegetal/0,25—5 părți tampon, pentru a asigura în toate extractele o concentrație proteică asemănătoare, chiar dacă țesuturile respective conțineau cantități variabile de proteină.

Distribuția cantitativă a proteinelor din cotiledoanele și restul embrionului de bob este înfățișată în tabelă, din care se observă că distribuția cantitativă a fracțiunilor electroforetice este diferită la cele două formațiuni. Astfel, în cotiledoane raportul legumină/vicilină este de 2,1 iar în restul embrionului acest raport nu are decît valoarea 0,4. Deși numărul fracțiunilor proteice este egal la cotiledoane și restul embrionului, există fracțiuni cu mobilități electroforetice caracteristice fiecărei formațiuni (prelegumina 2, postvicilina 1). Această deosebire nu a fost confirmată însă de datele reacțiilor imunochimice încrucișate efectuate între proteinele celor două formațiuni. S-a constatat că, cel puțin din punct de vedere imunochimic, între caracterul proteic al celor două formațiuni nu există nici o deosebire. Astfel, anticorpii din serul imun anticotiledoane sînt complet îndepărtați prin absorbție cu proteinele din restul embrionului și invers, proteinele din cotiledoane precipită toți anticorpii din serul imun antirest embrion. Neconcordanța dintre rezultate se poate explica considerînd că atît cotiledoanele, cît și restul embrionului, posedă anumite tipuri de antigene care, deși au o structură imunochimică asemănătoare, sînt alcătuite din populații de molecule cu mobilități electroforetice diferite. De altfel, trebuie precizat că nu este necesar ca molecule asemănătoare

din punct de vedere imunochimic să aibă și aceeași structură și proprietăți fizico-chimice. Identitatea imunochimică a proteinelor din cotiledoane și restul embrionului ne permite să vorbim de „caracterul antigenic unitar" al embrionului luat ca întrg. Această identitate constituie un caz particular al semințelor de bob, deoarece la semințele de fasole, de exemplu, am arătat că fiecare formațiune conține proteine protoplasmatice specifice [14]. Deosebirea dintre aceste două plante leguminoase este determinată de gradul diferit de dezvoltare intraseminală pe care îl ating embrionii lor. La fasole, diferențierea morfologică dintre cotiledoane și restul embrionului este mai marcată decît la bob, din care cauză și diferențierea antigenică dintre aceste două formațiuni este sesizabilă prin metodele folosite.

Proteinele din sămînța întreagă (nesecționată în cotiledoane și restul embrionului) au fost analizate, înaintea noastră, prin electroforeză pe hîrtie de E. Moustafa [15] și I. A. Weintraub și colaboratori [16]. Primul a reușit să separe, alături de cei doi componenți de bază — legumina și vicilina — încă doi componenți, prezenți însă într-o cantitate mică. Unul din aceștia (5,1% din proteina totală) are o viteză de migrare mai mare decît legumina și este probabil echivalent cu fracțiunea notată de noi prelegumina 1, iar componentul cu cea mai mică viteză de migrare (8,1% din proteina totală) este identic probabil cu fracțiunea notată de noi postvicilina 1. I. A. Weintraub și colaboratori nu au reușit să evidențieze decît componentele majoritare, legumina și vicilina, însă au arătat totodată că vicilina poate fi subfracționată pe cale chimică.

Complexitatea mai mare a proteinelor seminței de bob, evidențiată de noi, se datorește capacității de rezoluție electroforetică mai mare a gelului de agar decît a hîrtiei de filtru, și nu tamponului folosit, deoarece folosind hîrtia de filtru ca mediu suport am obținut și noi numai separarea celor doi componenți principali, legumina și vicilina [8].

Declanșarea procesului germinativ aduce importante schimbări în caracterul antigenic al restului embrionului. În primele 4 zile se petrece diferențierea lui morfologică în cele trei organe : rădăcină, tulpină și frunze. În această perioadă, așa cum se vede și în figura 1, numărul antigenelor care pot fi puse în evidență prin serul imun antirest embrion, în aceste formațiuni luate împreună, se micșorează.

Micșorarea numărului de antigene din restul embrionului germinat este cauzată, desigur, de hidroliza proteinelor. Ruperea structurii antigenice a unei fracțiuni poate duce însă și la separarea grupărilor determinante, pe molecule cu încărcare electrică diferită și, în acest caz, dimpotrivă număru de antigene crește [17]. Astfel se poate explica apariția liniei de precipitare notate cu *X*, care nu are echivalent în imunoelectroforegrama martor. Ulterior, în ziua a 4-a, acest antigen efemer este hidrolizat și dispare.

În organele nou formate, prezența antigenelor, care constituiau restul embrionului se recunoaște cu multă greutate. Astfel, între proteinele din rădăcina și tulpina plantulelor și serul imun antirest embrion nu se mai obține, prin tehnica dublei difuzii, decît o singură linie de precipi-

tare, dovadă că între aceste două formațiuni și embrionul care le-a dat naștere nu există decît un singur antigen comun. Aceste rezultate au fost obținute cu organe separate la 8, 16 și 25 de zile de la începerea germinației (fig. 2).

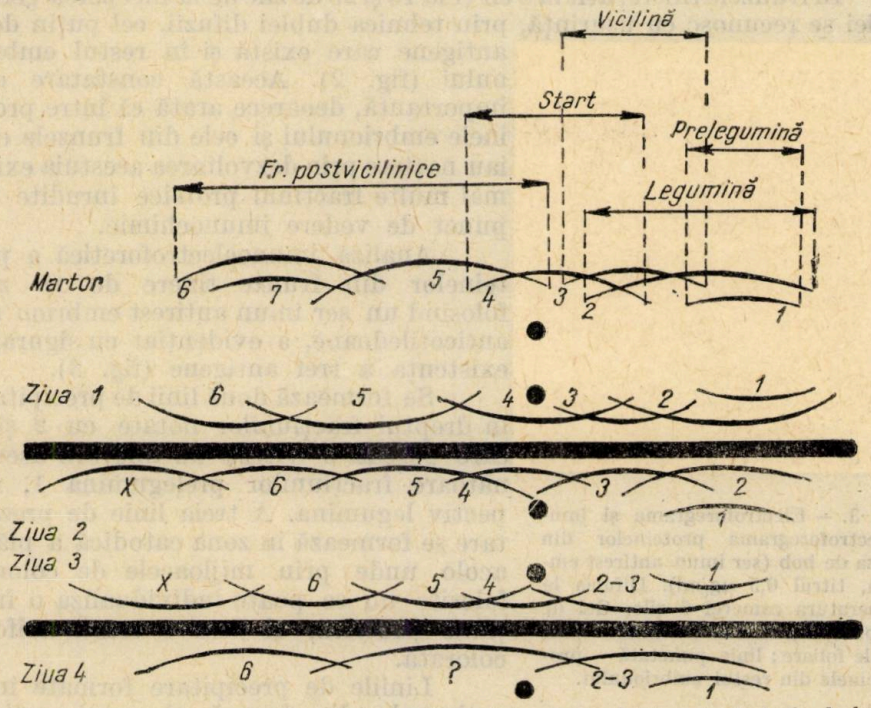


Fig. 1. — Imunoelectroforeza proteinelor din restul embrionului în primele 4 zile de la începerea germinației (ser imun de iepure antirest embrion, titrul 0,5 μg/ml). Difuzia la temperatura camerei, 4 zile.

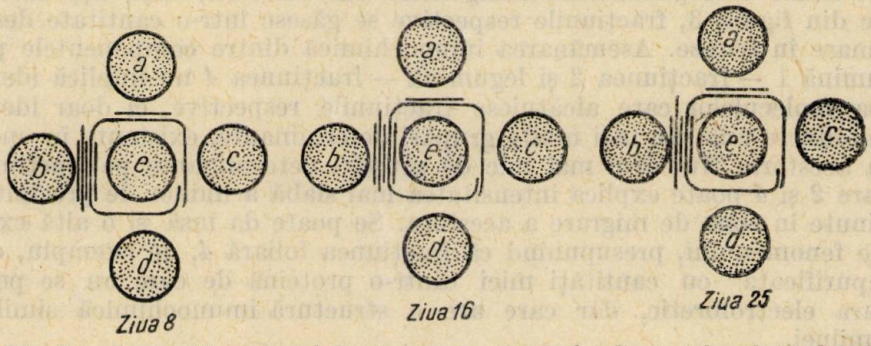


Fig. 2. — Dubla difuzie în gel de agar-agar a proteinelor din restul embrionului și alte organe ale plantulei, la diferite faze de germinație.

a — frunză; *b* — rest embrion; *c* — rădăcină; *d* — tulpină; *e* — ser imun de iepure antirest embrion.

Prin imunoelectroforeză s-a constatat că antigenul din rădăcină și tulpină, care dă o reacție încrucișată cu serul antirest embrion, are o viteză

de migrare electroforetică apropiată de aceea a leguminei. Desigur că atît rădăcina, cît și tulpina mai posedă o serie de alte antigene care se sesizează electroforetic, dar care nu pot fi evident detectate prin antiserul folosit.

În frunzele tinere, atît la 8 cît și la 16 și 25 de zile de la începerea germinației se recunosc cu ușurință, prin tehnica dublei difuzii, cel puțin două antigene care există și în restul embrionului (fig. 2). Această constatare este importantă, deoarece arată că între proteinele embrionului și cele din frunzele care iau naștere prin dezvoltarea acestuia există mai multe fracțiuni proteice înrudite din punct de vedere imunochimic.

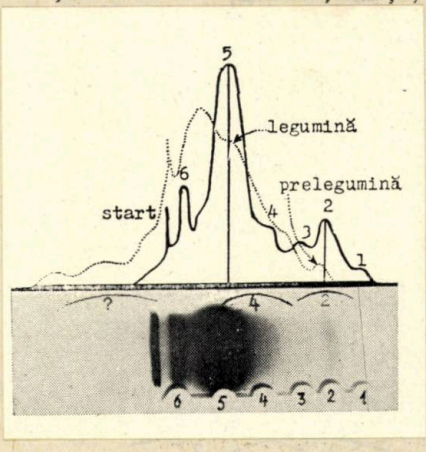


Fig. 3. — Electroforegrama și imunoelectroforegrama proteinelor din frunza de bob (ser imun antirest embrion, titrul 0,5 μg/ml). Difuzia la temperatura camerei 6 zile. Gel de agaroză [18]. Linia continuă — proteinele foliare; linia punctată — proteinele din restul embrionului.

Analiza imunoelectroforetică a proteinelor din frunze tinere de 16 zile, folosind un ser imun antirest embrion sau anticotiledoane, a evidențiat cu siguranță existența a trei antigene (fig. 3).

Se formează două linii de precipitare, în dreptul fracțiunilor notate cu *2* și *4*, care posedă o viteză de migrare asemănătoare fracțiunilor prelegumina 1, respectiv legumina. A treia linie de precipitare se formează în zona catodică a plăcii, acolo unde prin mijloacele de colorare folosite nu se poate individualiza o fracțiune proteică, ci doar o trenă uniform colorată.

Liniile de precipitare formate între antigenele din frunză și serul antirest embrion sau anticotiledoane, au avut o intensitate mult mai slabă decît liniile corespunzătoare antigenelor din embrion, deși, așa cum se vede din figura 3, fracțiunile respective se găsesc într-o cantitate destul de mare în frunze. Asemănarea imunochimică dintre componentele prelegumină 1 — fracțiunea *2* și legumină — fracțiunea *4* nu implică identitatea moleculelor care alcătuiesc fracțiunile respective, ci doar identitatea dintre una sau mai multe grupări determinante, existente în molecula acestora. Numărul mai mic de grupări determinante pe fracțiunile foliare *2* și *4* poate explica intensitatea mai slabă a liniilor de precipitare obținute în zona de migrare a acestora. Se poate da însă și o altă explicație fenomenului, presupunînd că fracțiunea foliară *4*, de exemplu, este „impurificată" cu cantități mici dintr-o proteină de care nu se poate separa electroforetic, dar care are o structură imunochimică similară leguminei.

Antigenul foliar *4* are o viteză de difuzie și de migrare electroforetică asemănătoare antigenului comun rădăcinii, tulpinii și embrionului (cotiledoane și restul embrionului), de aceea poate fi considerat, împreună cu acesta, ca un antigen posedat în comun de toate celulele plantei în toate fazele de dezvoltare. Aceste antigene, prezente în toate fazele dezvoltării

atît în sămînță cît și în rădăcină, tulpină și frunze, pot fi considerate ca fiind specifice speciei. Alături de aceste antigene, în diferite organe ale plantei există antigene organo-specifice, care apar pe măsura diferențierii țesuturilor și organelor și care reflectă fără îndoială specializarea funcțională a acestor organe. Evident că antigenele organo-specifice nu pot fi detectate prin serul imun antirest embrion sau anticotiledoane, însă apariția lor în procesul de morfogeneză și persistența lor în organele respective se poate constata pe cale electroforetică (fracțiunile foliare *1*, *3*, *5* și *6*).

Rezultatele noastre obținute pe frunze sînt în concordanță cu datele prezentate de I. K l o z și colaboratori [4]; ei au arătat că un ser anticotiledoane poate precipita specific 5,2% din proteinele frunzei de bob, iar un ser antifrunză precipită 8% din proteinele totale ale cotiledoanelor de bob.

Înrudirea imunochimică constatată la nivelul proteinelor din restul embrionului și frunze este un argument puternic împotriva părerii, încă destul de larg răspîndită, că între proteinele plantulei în dezvoltare și proteinele seminței care i-a dat naștere există o legătură mai mică decît între scleroproteinele părului, coarnelor și copitelor și proteinele țesuturilor vii ale animalului [19]. Diferențierea părților morfologice ale embrionului de bob se produce încă în timpul vieții intraseminale, el fiind de fapt o plantulă în miniatură alcătuită din aceleași părți principale ca și planta. Acestei diferențieri morfologice îi corespunde, desigur, și o diferențiere antigenică care face ca în restul embrionului, mai precis în gemulă, să existe deja sintetizate unele antigene foliare, ceea ce determină înrudirea imunochimică semnalată mai sus.

Pentru cunoașterea legilor de transformare progresivă a antigenelor în ontogeneza plantelor, ca și pentru stabilirea dinamicii formării antigenelor organo-specifice caracteristice plantelor mature, trebuie să se studieze cu antiseruri antiorgan corespunzătoare, capacitatea antigenelor embrionare de a interacționa cu anticorpi produși față de complexul antigenic al plantelor adulte. Studierea acestor reacții se va efectua în viitor.

Prezentată la redacție
la 16 mai 1962

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОРАСТАНИЯ У БОБОВ (*VICIA FABA*)

РЕЗЮМЕ

В зернах боба (*Vicia faba*) долевые белки одинаковы, с иммунохимической точки зрения, с белками других частей зародыша (почки, стебелька, корня, вместе взятых).

Указанная идентичность позволяет считать, что все зерно боба обладает однородным антигенным характером.

Развитие процесса прорастания сопровождается значительными изменениями антигенного характера остальной части зародыша, что вызывает уменьшение числа антигенов, которые удается идентифицировать иммунизированной противоостаточной сывороткой непроросшего зародыша. Уменьшение числа антигенов в остальной части проросшего зародыша вызвано гидролизом белков. Разрыв антигенного строения одной из фракций может также привести к разделению определяющих групп на различно заряженные молекулы и, в этом случае, появляется новая линия осаждения, не имеющая эквивалента на иммуноэлектрофореграмме непроросшего зародыша. В новообразованных органах можно выявить, даже через 25 дней после начала прорастания, наличие антигенов, составляющих остальную часть зародыша. Один из этих антигенов можно считать общим для всех клеток растения на всех стадиях развития. Между зародышем и листьями была констатирована более близкая иммунохимическая связь (три общих антигена), что является веским аргументом против мнения, согласно которому между белками развивающегося всхода и белками зерна, из которого он образовался, нет никакой связи.

Полученные результаты показывают, что иммуноэмбриологические исследования могут быть распространены и на растения, используя методы и пути исследования способствующие основанию этой науки.

ОБЪЯСНЕНИЕ РИСУНКОВ

Рис. 1. — Иммуноэлектрофорез белков остаточной части зародыша в первые 4 дня после начала прорастания (иммунизированная противоостаточная сыворотка зародыша кролика, титр 0,5 мг/мл). Диффузия при комнатной температуре, 4 дня.

Рис. 2. — Двойная диффузия в геле агар-агара белков остаточной части зародыша и других органов всхода на различных стадиях прорастания. *a* — лист; *b* — остаток зародыша; *c* — корень; *d* — стебель; *e* — иммунизированная противоостаточная сыворотка кролика.

Рис. 3. — Электрофореграмма и иммуноэлектрофореграмма белков листьев боба (иммунизированная противоостаточная сыворотка зародыша, титр 0,5 мг/мл). Диффузия при комнатной температуре 6 дней. Непрерывная линия — листьевые белки; пунктирная линия — белки остаточной части зародыша.

RECHERCHES IMMUNOCHIMIQUES SUR LA GERMINATION DE LA FÈVE (*VICIA FABA*)

RÉSUMÉ

On a démontré que dans les graines de fève (*Vicia faba*) les protéines des cotylédons sont identiques au point de vue immunochimique aux protéines se trouvant dans d'autres parties de l'embryon (gemmule, tigelle, radicule, prises ensemble). L'identité signalée justifie les auteurs à considérer la graine de fève en entier comme ayant un caractère antigénique unitaire.

Le déclenchement du processus germinatif amène d'importantes modifications du caractère antigénique du reste de l'embryon, en déterminant la diminution du nombre d'antigènes qui peuvent être identifiés à l'aide d'un sérum immunospécifique antireste embryon non germé. La diminution du nombre d'antigènes du reste d'embryon germé est provoquée par l'hydrolyse des protéines. La rupture de la structure antigénique d'une fraction peut aussi conduire à la séparation des groupements déterminants par les molécules à charge électrique différente et dans ce cas une ligne supplémentaire de précipitation fait son apparition, ligne qui ne possède pas d'équivalent dans l'immuno-électrophorégramme de l'embryon non germé. Dans les organes nouvellement formés on peut reconnaître, même 25 jours après le commencement de la germination, la présence d'antigènes qui auparavant constituaient le reste de l'embryon. L'un de ces antigènes peut être considéré comme étant possédé en commun par toutes les cellules de la plante, dans toutes les phases de leur développement. Entre l'embryon et les feuilles on constate une relation immunochimique plus étroite (trois antigènes communs), ce qui constitue un puissant argument contre l'opinion qu'entre les protéines de la plantule en croissance et les protéines de la graine qui l'a engendrée il n'y aurait aucune relation.

Les résultats montrent que les recherches immuno-embryologiques peuvent être étendues au domaine des plantes, en employant les méthodes et les voies d'investigation qui ont permis d'établir la base scientifique de cette discipline.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. — Immuno-électrophorèse des protéines du reste de l'embryon dans les premiers 4 jours après le début de la germination (sérum immunospécifique de lapin antireste embryon, titre 0,5 μg/ml). Diffusion à la température de la chambre, 4 jours.

Fig. 2. — Double diffusion dans du gel d'agar-agar des protéines du reste de l'embryon et des autres organes de la plantule, à différentes phases de la germination.

a — Feuille ; *b* — reste de l'embryon ; *c* — radicule ; *d* — tige ; *e* — sérum immunospécifique de lapin antireste embryon.

Fig. 3. — Electrophorégramme et immuno-électrophorégramme des protéines de la feuille de fève (sérum immunospécifique antireste embryon, titre 0,5 μg/ml). Diffusion à la température de la chambre, 6 jours. Gel d'agarose [18] En trait continu : protéines foliaires ; en pointillé : les protéines du reste de l'embryon.

BIBLIOGRAFIE

1. Б. В. Конюхов, *Изменение антигенных свойств тканей животных в онтогенезе.* Успехи соврем. биол., **45** *1*, 97 (1958).
2. N. N. Jukov-Verejnikov, R. V. Petrov, *Imunologia creşterii şi dezvoltării celulelor şi ţesuturilor, un nou capitol in biologie.* An. rom.-sov., biol., **13**, *4*, 119 (1959).
3. O. Moritz, *Die Serologie der pflanzlichen Eiweisskörper,* în W. Ruhland, *Handbuch der Pflanzenphysiologie.* Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1958, **VIII**, 390.
4. J. Kloz, V. Turková, E. Klozová, *Serological investigation of taxonic specificity of proteins in various plant organs in some taxons of the family Viciaceae.* Biol. Plantarum (Praha), **2**, *2*, 126 (1960).

5. E. R. GOLD, *Imunologie practică*. Ed. medicală, București, 1957, 145.
6. O. OUCHTERLONY, *Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in correlated systems of diffusion*. Acta Path. Scand., **32**, 231 (1953).
7. P. GRABAR, P. BURTIN, *Analyse immuno-électrophorétique. Ses applications aux liquides biologiques*. Masson, Paris, 1960.
8. V. GHEȚIE, *Mărirea capacității de rezoluție electroforetică a tamponului borat prin adăugarea ionului fosfat*. Studii și cercetări de biochimie, **IV**, *3*, 397 (1961).
9. S. M. IDU, S. CÎMPEANU, *Electroforeza*. Ed. medicală, București, 1957, 57.
10. L. MEZROBEANU, C. ZILIȘTEANU, N. MITRICĂ, *Studiul imunoelectroforetic al serurilor antiom*. Med. internă, *1*, 153 (1959).
11. J. HEREMANS, *Les globulines sériques du système gamma. Leur nature et leur pathologie*. Ed. Arscia S. A., Masson Bruxelles-Paris, 1961, 38—42.
12. J. BÖSZÖRMENYI, *A simple method for absorbing heterologus antibodies from precipitating sera*. Nature, **181**, *4619*, 1344 (1958).
13. R. HEITEFUSS, J. BUCHANAN-DAVIDSON, M. A. STAHMANN, *The stabilization of extract of cabbage leaf proteins by polyhydroxy compounds for electrophoretic and immunological studies*. Arch. biochem. biophys., **85**, 200 (1959).
14. V. GHEȚIE, L. BUZILĂ, *Proteinele de rezervă și proteinele protoplasmatice din sămînța de fasole* (Phaseolus vulgaris). Studii și cercetări de biochimie, **IV**, *2*, 241 (1961).
15. E. MOUSTAFA, *Paper electrophoresis separation of the proteins of some leguminous seeds*. Nature, **183**, 199 (1959).
16. И. А. ВАЙНТРАУБ, А. Д. ШУТОВ, В. Г., КЛИМЕНКО, *О глобулинах семян вики*. Биохимия, **27**, *2*, 349 (1962).
17. M. KAMINSKI, *Application de méthodes immunochimiques à l'étude de la protéolyse*, Exp. ann. Biochim. med., **XII**, 85 (1960).
18. V. GHEȚIE, D. MOȚET-GRIGORAȘ, *Electroforeza și imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză*, Studii și cercetări de biochimie, vol. **V**, *3*, 409 (1962).
19. F. STEWARD, I. THOMPSON, *Protein and protein metabolism in plants*, în H. NEURATH, K. BAILEY, *The Proteins*. Acad. Press. Inc., New York, 1953.

INFLUENȚA TRANSPLANTĂRII EMBRIONULUI DE ORZ PE ENDOSPERMUL DE SECARĂ ASUPRA UNOR PROCESE BIOCHIMICE LA HIBRIZI, ÎN CORELAȚIE CU REZISTENȚA LA GER

DE

I. BRAD, IULIA LÁSZLÓ, GH. VALUȚĂ și CLEMENȚA MICLEA

În cîteva lucrări anterioare au fost prezentate unele rezultate obținute la Institutul de cercetări agricole, referitoare la studiul asupra rezistenței la ger [3], [4], [5], [23]. Cercetările comparative de biochimie și fiziologie efectuate între specii diferite (secară, grîu, și orz) și între soiuri de orz și grîu autohtone sau străine au dus la următoarele concluzii :

Rezistența la ger se caracterizează printr-o mai slabă activitate a catalazei și peroxidazei, prin consum de oxigen, eliminare de bioxid de carbon și transpirație mai redusă. De asemenea, la speciile sau soiurile rezistente se constată un conținut mai mic de proteină brută, un conținut mai mare de substanțe reducătoare totale, un conținut mai mare de vitamină C și un conținut mai mare de substanță uscată. Capacitatea de reținere a apei legate este mai mare în timpul iernii.

Aceste constatări dovedesc o stare de repaus mai profundă, ca rezultat al micșorării intensității proceselor oxi-biotice la plantele mai rezistente.

S-a arătat în aceste lucrări concordanța între constatările noastre și constatările altor cercetători [2], [7], [10], [13], [14], [16], [24].

Am considerat că ar fi interesant să prezentăm în lucrarea de față rezultatele cercetărilor comparative întreprinse de noi între linia de secară Moara Domnească 1(MD 1), soiul de orz Cenad 396 (C 396) și liniile de orz Bărăgan 6/51 (Bg 6/51), Bărăgan 12/51 (Bg 12/51) și Bărăgan 391/51 (Bg 391/51).

Liniile Bg 6/51 și Bg 12/51 au fost obținute prin transplantarea embrionului de orz pe endosperm de secară, iar linia Bg 391/51 a fost obținută prin selecție individuală. Dovedindu-se și în condiții de cîmp rezistente la ger, ele au fost luate în considerație pentru a se obține infor-

mații referitoare atît la mecanismul rezistenței la ger cît și la influența hibridării vegetative asupra biochimismului plantei.

Numeroase cercetări au fost întreprinse pentru studierea influenței hibridării vegetative asupra metabolismului descendenților, constatîndu-se modificări remarcabile.

S-a constatat de exemplu creșterea conținutului în vitamină C și în pigmenți carotenoidici la floarea-soarelui pe care s-a altoit topinamburul [9]; în cazul altoirii pe tutun apare nicotina în tomate și alte solanacee care nu produc nicotină [11]. Determinările de peroxidază și invertază executate la măr au dus la constatarea creșterii sau scăderii activității acestor fermenți, în funcție de caracterul timpuriu sau tardiv al portaltoiului [19]. S-a observat de asemenea că unele procese biochimice schimbate, constatate în prima generație, se transmit generațiilor următoare la tomate obținute prin hibridare vegetativă [22].

Alte date care demonstrează influența hibridării vegetative asupra metabolismului hibrizilor și descendenților au fost arătate de numeroși cercetători [1], [6], [8], [11], [12], [15], [17], [18], [20], [21].

Date referitoare la biochimismul hibrizilor de orz obținuți după metoda Secun și în corelație cu rezistența la ger, nu am găsit în literatură.

MATERIAL ȘI METODE

Soiul de secară MD 1 este obținut din soiul Petkus prin selecție individuală.

Soiul de orz Cenad 396 este raionat în întreaga țară.

Linia Bărăgan 391 a fost obținută prin selecție individuală din soiul de orz de toamnă Cenad 396, procedîndu-se astfel:

În anul 1952 s-au extras elite care au fost analizate în laborator și apoi au fost semănate, toamna, în cîmpul de selecție anul I. Din acestea au fost extrase din nou elite, care în toamna anului 1953—54 au fost semănate din nou în cîmpul de selecție anul al II-lea. În anul 1954—55 s-a făcut o nouă selecție, reținîndu-se în anii următori pentru verificarea în cîmpul de control și culturi comparative liniile cele mai valoroase. Mai rezistentă la ger decît soiul Cenad 396 s-a dovedit mai ales linia Bg 391.

Liniile Bărăgan 6/51 și Bărăgan 12/51 au fost obținute în anul 1951—52 prin hibridarea vegetativă între secara Petkus și orzul C 396.

S-a transplantat embrionul de orz pe endospermul de secară după metoda Secun. După altoire boabele au fost semănate în cîmp, iar din plantele care au rezistat peste iarnă s-au extras elite care în anul următor au fost introduse în procesul de selecție. Din tot materialul s-au evidențiat liniile Bg 6/51, și Bg 12/51.

Cercetările noastre au fost întreprinse în iarna anului 1957—58. Însămînțările au fost făcute în cîmpul experimental al Institutului de cercetări agricole pe parcele de 12 m², în 4 repetiții. Însămînțarea s-a făcut pe un teren pe care fusese cultivată mazăre ca îngrășămînt verde. Analizele s-au făcut pe planta întreagă, recoltîndu-se cîte 50 de plante din fiecare repetiție și ținîndu-se seama ca la recoltare să fie luate plan-

tele care corespund creşterii şi dezvoltării medii a plantelor din repetiţii. Conţinutul în substanţă uscată, conţinutul în substanţă reducătoare activitatea catalazei şi peroxidazei, aciditatea totală titrabilă şi pH-ul au fost determinate prin metodele menţionate în lucrările noastre anterioare [3], [4], [5], [23].

S-au făcut în paralel şi unele observaţii asupra biologiei plantelor. S-a constatat că la liniile Bg 6/51 şi Bg 12/51 plantele au o culoare verde mai închisă decît la linia Bg 391/51 şi soiul C 396 şi mai deschisă decît la secară. Ele prezentau de asemenea la baza frunzelor striaţiuni slab violete antocianice, asemănătoare cu cele de la secară. Aristele spicelor la liniile Bg 6/51 şi Bg 12/51 aveau o culoare spre violet, întocmai ca şi aristele spicelor de secară. Între linia Bg 391/51 şi soiul C 396 nu s-au observat diferenţe morfologice remarcabile.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Plantele au fost recoltate din cîmp ţinîndu-se seama de variaţiile de temperatură. Curba variaţiilor de temperatură şi precipitaţii între 1/11 1957 şi 30/7 1958 a fost prezentată într-o lucrare anterioară [4].

După perioadele cu temperaturi scăzute frunzele plantelor de orz C 396 aveau vîrful frunzelor puţin ars, ceea ce nu s-a observat de loc la secară şi foarte puţin sau de loc la liniile Bg.

Tabela 1

Conţinutul în substanţă uscată (%)

Data	Secară MD 1	Orz Bg 6/51	Orz Bg 12/51	Orz Bg 391/51	Orz C 396
5 XI	14,13	12,95	13,43	12,84	13,21
21 XI	17,16	17,26	18,83	18,06	18,64
16 XII	21,56	22,52	23,37	18,65	22,83
21 I	19,78	19,18	21,27	23,38	18,31
10 II	16,42	15,50	15,21	16,01	15,44
10 III	17,02	20,30	18,33	17,39	19,91
10 IV	14,18	14,07	14,63	16,10	14,81
22 IV	14,28	16,76	15,37	14,74	16,81
28 IV	14,19	14,20	13,64	13,33	14,65
14 V	22,97	21,90	20,55	19,63	21,52
26 V	33,82	29,02	29,98	30,65	28,95
30 V	37,06	36,79	44,05	39,31	34,43

Analizele biochimice efectuate au dat următoarele rezultate :

Conţinutul de substanţă uscată creşte cînd scade temperatura şi scade cînd creşte temperatura în timpul iernii. El este mai mare la linia Bg 12/51 decît la Bg 6/51, Bg 391/51 şi soiul C 396 şi chiar decît la secară (tabela 1).

Conţinutul în substanţe reducătoare creşte cu scăderea temperaturii în timpul iernii. El este mai mare la secară şi mai mic la linia Bg 12/51,

după care urmează, fără diferențe prea mari, liniile Bg 6/51, Bg 391/51 și soiul C 396 (tabela 2).

Activitatea peroxidazei crește cu scăderea temperaturii ; în timpul primăverii și verii, temperatura crescînd, scăderea este puternică și tinde

Tabela 2

Conținutul în substanțe reducătoare al plantelor (% zahăr total în substanță uscată)

Data	Secară MD 1	Orz Bg 6/51	Orz Bg 12/51	Orz Bg 391/51	Orz C 396
5 XI	9,30	9,80	10,50	9,85	8,10
28 XI	14,20	9,80	13,05	12,25	12,05
16 XII	21,75	23,80	24,50	21,90	21,40
28 XII	11,80	10,10	11,05	10,65	9,50
30 XII	17,90	11,60	13,10	12,65	13,50
8 I	24,75	18,05	16,80	19,95	19,75
22 I	27,55	28,80	29,80	27,50	30,35
1 II	19,25	17,50	18,35	17,05	16,90
10 II	24,50	25,50	27,50	24,85	18,35
19 II	8,05	7,75	12,30	5,50	6,70
12 III	9,20	8,30	8,15	8,85	8,70
31 III	10,45	20,65	17,60	11,60	13,50
10 IV	11,10	12,10	12,45	11,30	9,20
21 IV	13,90	21,60	18,50	13,80	21,30
14 V	6,55	10,45	7,80	8,20	10,45
26 V	21,05	20,30	20,85	20,15	20,25

către valori foarte mici. Activitatea peroxidazei este mult mai mică la secară și net diferențiată față de liniile Bg și soiul C 396. Pentru perioada cu temperaturi mai scăzute, cu media temperaturilor sub 0°C, activitatea peroxidazei este mai mică la linia Bg 12/51 și mai mare la liniile Bg 6/51

Tabela 3

Activitatea peroxidazei în mg vitamina C oxidate în 2 min de extractul dintr-un g substanță verde, în raportul 1/20 soluție pH 4,5, la 20°C

Data	Secara MD 1	Orz Bg 6/51	Orz Bg 12/51	Orz Bg 391/51	Orz C 396
12 XI	14,04	18,00	16,02	21,06	30,60
18 XII	5,81	18,92	13,61	14,77	20,91
30 XII	7,21	31,49	33,62	28,04	27,88
16 I	4,00	22,72	22,08	28,72	27,84
4 II	7,39	20,29	17,54	20,46	15,48
24 II	6,33	42,35	42,76	32,73	42,24
12 III	6,31	38,04	35,47	31,10	30,94
31 III	6,51	29,04	30,62	33,79	21,12
21 IV	2,62	3,77	5,74	6,56	5,24
15 V	0,99	0,85	1,13	2,69	2,13
30 V	2,27	2,98	2,84	2,69	1,42

și Bg 391/51, cea mai mare fiind la soiul C 396. Variația activității peroxidazei este mai mică și mai promptă la variațiile de temperatură în cazul secarei (tabela 3).

Activitatea catalazei este de asemenea cea mai mică la secară şi sistematic mai mică la linia Bg 12/51 decît la soiul C 396. Chiar şi la liniile Bg 6/51 şi Bg 391/51 activitatea catalazei este în majoritatea cazurilor, mai mică decît la soiul C 396.

Tabela 4

Activitatea catalazei
(ml O_2 degajat în 3 min. la 20°C)

Data	Secara MD 1	Orz Bg 6/51	Orz Bg 12/51	Orz Bg 391/51	Orz C 396
11 XI	42,6	15,0	49,0	49,0	57,0
10 XII	61,0	71,0	70,0	66,0	64,6
28 XII	53,0	72,0	62,0	58,0	74,0
16 I	60,8	68,0	65,0	52,0	76,0
4 II	54,0	84,0	62,0	66,0	85,5
24 II	27,0	60,0	33,0	40,4	54,0
11 III	47,6	70,6	62,5	84,8	81,6
7 IV	39,6	88,0	86,2	110,6	106,2
21 IV	96,0	110,0	117,0	106,0	161,2
15 V	240,0	170,4	224,0	252,0	206,4

Activitatea catalazei scade cu temperatura, variind în sens invers faţă de activitatea peroxidazei (tabela 4).

Aciditatea titrabilă este cea mai mare la secara MD 1, urmată de linia Bg 12/51 şi de celelalte soiuri şi linii. Aciditatea creşte cu scăderea temperaturii. Şi în ceea ce priveşte aciditatea totală titrabilă, linia Bg 12/51 se detaşează faţă de celelalte linii de orz (tabela 5).

Tabela 5

Aciditatea totală titrabilă a plantelor
(ml KOH 0,1 N la 100 g substanţă verde)

Data	Secara MD 1	Orz Bg 6/51	Orz Bg 12/51	Orz Bg 391/51	Orz C 396
5 XI	17,50	15,35	14,50	13,20	12,20
11 XII	31,20	23,55	26,75	27,50	23,55
8 I	29,50	23,40	27,65	27,65	25,35
1 II	31,20	24,10	28,25	28,80	25,30
19 II	27,10	20,80	23,35	21,93	20,30
10 III	38,10	21,25	17,30	29,60	32,50
31 III	30,10	29,00	35,50	42,50	30,10
22 IV	27,15	21,50	30,80	29,20	25,10
15 V	39,50	35,50	37,10	33,20	34,20
3 V	48,00	36,50	40,10	28,00	42,10

Analiza pH-ului extractului folosit pentru determinarea acidităţii nu a dus la constatarea unor diferenţe ce s-ar putea lua în consideraţie (tabela 6).

CONCLUZII

La plantele verificate practic a fi mai rezistente la ger, activitatea catalazei și peroxidazei este mai mică, iar conținutul în substanțe reducătoare, substanță uscată și aciditate totală titrabilă sînt mai mari.

La materialul obținut prin transplantarea embrionului de orz pe endosperm de secară s-au observat modificări ale metabolismului, constatate analitic, care arată deplasarea proceselor în sensul favorizării rezistenței la ger. Aceste modificări favorabile ale metabolismului sînt

Tabela 6

pH-ul extractului apos utilizat la determinarea acidității

Data	Secara MD 1	Orz Bg 6/51	Orz Bg 12/51	Orz Bg 391/51	Orz C 396
11 XII	6,20	6,45	6,05	5,60	5,75
8 I	6,40	6,45	6,35	6,50	6,50
1 II	6,34	6,36	6,41	6,41	6,23
19 II	6,44	6,40	6,44	6,40	6,44
15 V	6,33	6,34	6,50	6,46	6,54

foarte clare la linia Bg 12/51, ceea ce dovedește că prin nutrirea embrionului de orz cu substanțe de nutriție din endospermul de secară, metabolismul orzului transplantat se apropie de metabolismul secarei prin creșterea sau scăderea în același sens a valorii unor indici biochimici, în speță conținutul în substanțe reducătoare totale, și în substanța uscată, aciditatea totală titrabilă și activitatea catalazei și peroxidazei. S-au constatat de asemenea și modificări ale unor caractere morfologice, demne de luat în considerare fiind mai ales striațiile slab violete antocianice de la baza frunzelor. Aceasta sugerează ideea influenței antocianilor, a precursorilor sau a succesorilor lor asupra metabolismului plantelor, în sensul măririi rezistenței la ger. Studierea acestora ar putea duce la descoperirea unei clase de substanțe care să fie folosită la tratarea plantelor în vederea măririi rezistenței la ger.

Prezentată la redacție
la 7 august 1962

Institutul de cercetări pentru cereale și plante tehnice, Secția de fiziologie și biochimie vegetală, București

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕСАДКИ ЗАРОДЫША ЯЧМЕНЯ НА ЭНДОСПЕРМ РЖИ НА НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У ГИБРИДОВ В СВЯЗИ С МОРОЗОСТОЙКОСТЬЮ

РЕЗЮМЕ

Были проведены сравнительные анализы некоторых биохимических показателей на линии ржи MD1 (Моара Домняскэ 1), на сорте ячменя С 396 (Ченад 396), на линии ячменя Bg 391/51 (Бэрэган 391/51), полученном путем индивидуальной селекции из сорта Ченад 396, и на

линиях Bg 6/51 (Бэрэган 6/51) и Bg 12/51 (Бэрэган 12/51), полученных путем вегетативной гибридизации сорта ячменя 396 с сортом ржи Петкус. Из сорта ржи Петкус была получена путем индивидуальной селекции линия MD 1.

Практический контроль линий ячменя показал, что они более морозостойки, чем сорт C 396. Выполненные биохимические анализы приводят к выводу, что активность каталазы и пероксидазы слабее у более морозостойких растений. Содержание сахаров, процентное содержание сухого вещества и общая, поддающаяся титрованию кислотность больше у более стойких растений. Эти результаты показывают, что у полученного, путем вегетативной гибридизации, материала были вызваны изменения обмена, которые можно констатировать при биохимическом анализе и которые благоприятствуют улучшению морозостойкости. Наиболее выраженные изменения были замечены на линии B 12/51.

Были также вызваны значительные морфологические изменения, в частности слабая фиолетовая окраска основания листьев.

Вероятно, что антоцианины, их предшественники или вещества, получающиеся из них, сильно влияют на обмен и что это увеличивает морозостойкость. Указанный класс соединений следует исследовать с целью его применения для улучшения морозостойкости.

INFLUENCE QUE LA TRANSPLANTATION DE L'EMBRYON D'ORGE SUR L'ENDOSPERME DE SEIGLE EXERCE SUR QUELQUES PROCESSUS BIOCHIMIQUES DES HYBRIDES EN CORRÉLATION AVEC LA RÉSISTANCE AU GEL

RÉSUMÉ

On a examiné comparativement quelques indices biochimiques présentés par la lignée de seigle MD 1 (Moara Domnească 1), obtenue par sélection individuelle à partir de la variété de seigle Petkus, par la variété d'orge C 396 (Cenad 396), par la lignée d'orge Bg 391/51 (Bărăgan 391/51), obtenue par sélection individuelle à partir de la variété Cenad 396, et par les lignées Bg 6/51 et Bg 12/51 (Bărăgan 6/51 et 12/51), obtenues par hybridation végétative entre la variété d'orge C 396 et la variété de seigle Petkus.

La vérification pratique des lignées d'orge a permis de constater que celles-ci sont plus résistantes au gel que la variété C 396. Les analyses biochimiques effectuées ont démontré que l'activité de la catalase et de la péroxydase sont moindres chez les plantes plus résistantes au gel. La teneur en sucres, le pourcentage de matière sèche et l'acidité totale titrable sont par contre plus importantes chez les mêmes plantes. Ces

résultats prouvent que dans le matériel réalisé par l'hybridation végétative se produisent des modifications du métabolisme qui sont décelables par l'analyse biochimique et favorables à un accroissement de la résistance au gel. Les plus fortes modifications ont été observées chez la lignée Bg 12/51.

On a obtenu aussi de remarquables modifications morphologiques, telles que la coloration faiblement violette de la base des feuilles.

Il est probable que les anthocyanes, leurs précurseurs ou leurs successeurs, ont une forte influence sur le métabolisme, influence favorisant aussi la résistance au froid. Des recherches sur cette classe de substances seraient intéressantes en vue de leur utilisation pour augmenter la résistance des plantes au gel.

BIBLIOGRAFIE

1. БЫРСКИХ Н. А., *Биохимические изменения, происходящие в семенах тыквы под влиянием межвидовой прививки.* Труды Плодовод. Инст. „И. В. Мичурина", 1960, **II**.
2. BLAGOVESCENSCHI A. V., *Bazele biochimice ale procesului de evoluţie a plantelor,* traducere din l. rusă, Ed. agro-silvică de stat, Bucureşti, 1953.
3. BRAD I., LÁSZLÓ IULIA, *Studiul comparativ al cîtorva indici biochimici şi fiziologici la secară, grîu şi orz în condiţiile de iernare ale anului 1957—58.* Studii şi cercetări de biochimie, **III**, *1* (1960).
4. BRAD I., LÁSZLÓ IULIA, VALUȚĂ GH., *Studiul fiziologic şi biochimic asupra comportării unor soiuri de orz în condiţii de iernare.* Analele Inst. de cercetări agronomice, 1959, ser. C, **XXVII**.
5. BRAD I., LÁSZLÓ IULIA, VALUȚĂ GH., SOTIRIU V., *Contribuţii la stabilirea unor indici biochimici şi fiziologici de rezistenţă la ger a cerealelor de toamnă.* Studii şi cercetări de biologie, ser. biologie vegetală, **XIII**, 2 (1961).
6. БРЯНЦЕВА З. Н., *Об изменениях в азотистом обмене у растений под влиянием прививок.* Известия Сибирск. Отдел. Акад. Наук СССР, 8 (1959).
7. CHIRILEI H., MAVROMATI E., *Contribuţii la studiul rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă.* Extras din Lucrările sesiunii ştiinţifice din 1—6 februarie. Ed. agro-silvică de stat, Bucureşti, **1**, 1955.
8. DEVAY MARTA, *Tojasgyümolcs altványok biokemiai analizise az analyhatás Kialakulása.* Jubilemi todományos Konferenciaja. Mastonvásár, 1959, December 8—10.
9. ЕРМАКОВ А. И., *Биохимические изменения у привитых растений.* Вестник социалистического растениеводства, 2 (1940).
10. *Физиология устойчивости растений.* Труды Конференции, 3—7 марта 1959, Акад. Наук СССР, Москва, 1960.
11. ИЛЖИН Г. С., *О закономерностях образования алкалоидов у привитых растений табака.* Проблемы биохимии в мичуринской биологии, Издание АН СССР, **I** (1949).
12. КРУЖИЛИН А. С., *Взаимовлияние привоя и подвоя растений.* Москва, Изд. Акад. Наук СССР, 1960.
13. LEVITT J., *The hardiness of plants.* New York, 1956.
14. ЛЬВОВ Л. Д., АЛТУХОВА Л. А., *Витамин С и его влияние на морозостойкость озимых сортов пшеницы.* Доклады Академии Наук СССР, **LXXX**, 1 (1951).
15. МАМПОРИА Ф. Д., *Обмен веществ и образование вегетативных гибридов с различной наследственностью.* I. Агробиология , *1* (1961).
16. MAXIMOV N. A., *Fiziologia plantelor,* traducere din l. rusă, Ed. de stat, Bucureşti, 1951.
17. ПИЛЛЕТ П. В., *О физиологических и биологических изменениях образованных прививками у яровой пшеницы.* Агробиология, *3* (1958).
18. ПОДА-ЧИКАЛЕНКО В. Т., *Некоторые биохимические изменения при прививках растений.* Известия Сибирск. отдел. Акад. Наук СССР, *6* (1960).
19. РУБИН Б. А., СИСАКЯН Н. М., *Ферментативные системы мичуринских сортов яблоки.* Проблемы биохимии в мичуринской биологии, Изд. АН СССР, **I** (1949).

20. САГАЙДАК И. Н., *Увеличение содержания сухих веществ сахаров, пигментов и ферментов у привитых растений моркови.* Доклады Акад. Наук СССР, I (1961).
21. СИСАКЯН Н. М., *Биохимия обмена веществ.* Изд. АН СССР, Москва, 1954,
22. СИСАКЯН Н. М., ГРУЩЕНКО И. Ч., ВАСИЛЬЕВА Н. В., *Наследование приобретенных биохимических признаков в семенных потомствах вегетативных гибридов.* Проблемы биохимии в мичуринской биологии, I (1949).
23. VALUȚĂ GH., BRAD I., LÁSZLÓ IULIA, *Schimbări fiziologice şi biochimice la orzul de toamnă în condiţiile de iernare ale anului 1956—1957.* Studii şi cercetări de biochimie, II, *2* (1959).
24. ВАСИЛЬЕВ И. М., *Зимовка растений*, Москва, 1956.

5 c. — 4328

BIOCHIMIA CREIERULUI

II. STUDII ASUPRA CANTITĂȚII ȘI VITEZEI DE REFACERE A LIPIDELOR TOTALE DIN CREIER

DE

I. F. DUMITRU

Despre existența unei mari cantități de lipide în creier sînt numeroase indicații în literatura științifică. H. H. Williams și colaboratori [15], [16] studiază atît conținutul lipidelor în creier cît și evoluția lor cantitativă în funcție de vîrsta animalului și de dieta la care acesta este supus.

Conținutul deosebit de mare al lipidelor, în comparație cu alte substanțe organice prezente în creier, a condiționat numeroase cercetări, iar cantitatea relativ constantă a lipidelor totale atît în creier, cît și în alte organe, a determinat pe cercetători să considere vreme îndelungată că lipidele acestor organe sînt inactive metabolic și îndeplinesc numai o funcție plastică, structurală. Utilizarea izotopilor radioactivi, îndeosebi în decursul ultimelor două decenii, a demonstrat că lipidele sînt metabolic active și pot fi sintetizate de organismul animal din diferiți precursori ca : acidul acetic, glucoza, galactoza, serina, etanol-amina, glicocolul ș.a. [1], [2], [5], [10]—[13].

J. G. Coniglio, C. E. Anderson și C. S. Robinson [5], J. T. Van Bruggen, T. T. Hutchens, C. K. Claycomb și E. S. West [14] urmăresc încorporarea carbonului radioactiv al acidului acetic în acizi grași, colesterol, lipide totale izolate din ficat, tractul gastro-intestinal, piele, cordul spinal și creierul șobolanilor. Autorii stabilesc timpul în care radioactivitatea substanțelor cercetate atinge o valoare maximă în organele enumerate, fără a cerceta însă viteza de refacere a acestora și procentul de carbon radioactiv încorporat în fiecare substanță.

M. I. Prohorova și Z. N. Tupicova [11] au stabilit că după o oră de la administrarea $CH_3—{}^{14}COOH$, carbonul radioactiv al li-

pidelor totale din creier formează 50% din carbonul radioactiv descoperit în țesutul cerebral. Ulterior, M. I. Prohorova și colaboratori [12] comunică faptul că procentul de carbon radioactiv descoperit în lipidele din creier variază între 50—70%, valoarea activității specifice relative a lipidelor totale variind însă în limite largi.

Numărul mic de experiențe [11], rezultatele contradictorii obținute [11], [12], precum și lipsa de date experimentale asupra refacerii în timp a fracției lipidelor totale din creier ne-a determinat să studiem viteza de refacere a acestei fracții, utilizînd acetat de sodiu marcat cu ^{14}C pe gruparea carboxilică. În scopul determinării procentului de carbon radioactiv încorporat în lipidele totale s-a dozat conținutul lipidelor din creier.

MATERIAL ȘI METODE

Pentru cercetarea lipidelor totale din creierul animalelor adulte s-au folosit metodele descrise de J. Folch, J. Ascoli, M. Lees, J. A. Meath și F. N. Le Baron [8] și J. Folch, M. Lees și G. M. Sloane-Stanley [9] în modificarea descrisă mai jos. Principiul metodei constă în următoarele : lipidele totale sînt extrase din țesutul cerebral cu o mixtură de cloroform-metanol (2 : 1) și extractul obținut este eliberat de impuritățile acvosolubile, care sînt extrase împreună cu lipidele totale din creier, prin spălare timp de 24 de ore cu apă la temperatura camerei.

Această metodă de dozare cantitativă a lipidelor totale pe cale gravimetrică este foarte comodă deoarece permite pe lîngă dozare cantitativă și determinarea activității specifice în una și aceeași probă de țesut.

Experiențele au fost efectuate pe șobolani albi, în greutate de 80—120 g, cărora cu 1 sau 3 ore înainte de sacrificare li s-a injectat intraperitoneal acetat de sodiu radioactiv (30 μc la 100 g greutate). Animalele au fost sacrificate prin introducerea lor în aer lichid, după care creierul animalelor a fost extras repede din cutia craniană, curățat atent de membranele aderente și vasele sangvine mari, îndepărtat cerebelul și în stare congelată mojarat pînă la obținerea unei pudre albe, omogene.

Obținerea extractului lipidic și purificarea lui. Probele de țesut cerebral congelat, care nu depășesc 180—250 mg, au fost recoltate într-un balon cotat cu dop rodat de 25 ml în care în prealabil s-a pipetat 15 ml mixtură cloroform-metanol (2 : 1). Conținutul balonului se agită după recoltarea probelor în decurs de 5—10 min, apoi se aduce la semn, din nou se agită și după o perioadă de extracție egală cu 10 min conținutul se filtrează, folosind în acest scop un filtru Pond. cineris unius filtr. nr. 589[3].

Îndepărtarea impurităților acvosolubile nelipidice s-a efectuat pe calea spălării extractului lipidic cu apă distilată. În acest scop, într-un pahar Hagedorn cu un volum de 25 ml se pipetează 10 ml apă distilată și apoi încet și atent, evitînd agitarea și amestecul celor două lichide, se pipetează 10 ml de extract lipidic. Paharul Hagedorn este apoi cufundat într-un pahar Berzelius cu o capacitate de 500—600 ml și care

conține 400—500 ml apă distilată. Paharul Berzelius se acoperă cu o placă de sticlă și se lasă în repaus timp de 24 de ore. După această perioadă de timp, în paharul Hagedorn se observă trei faze : faza superioară, limpede, acvometanolică ; faza inferioară, opacă, cloroformică și la limita de separare a celor două faze o peliculă albă, densă și unitară care conține lipide și proteolipide.

Uscarea și dozarea gravimetrică a precipitatului lipidic. Paharul Hagedorn este atent scos din paharul Berzelius și faza superioară îndepărtată cu ajutorul unei pompe de apă, evitînd distrugerea peliculei, în care scop deasupra acesteia se lasă un strat de lichid cu o grosime de 2—3 mm. În pahar se pipetează apoi 3—5 ml metanol pentru dizolvarea peliculei lipidice și conținutul se agită. În cazul cînd pelicula nu se dizolvă complet se adaugă metanol, picătură cu picătură, pînă ce soluția devine perfect transparentă.

După dizolvarea completă a peliculei lipidice conținutul paharului este cantitativ trecut, prin spălări repetate ale paharului cu cantități mici de metanol (0,5—1 ml), într-o fiolă de cîntărit. Uscarea extractului lipidic s-a efectuat mai întîi la temperatura camerei, timp de 24 de ore, iar apoi în termostat la temperatura de 50—60°C. Uscarea extractului se continuă pînă la obținerea, prin cîntărirea repetată a fiolei, a unei tare constante. Prin diferența dintre greutatea capsulei de cîntărire fără și cu precipitat lipidic (a), luînd în considerare cantitatea de țesut luată pentru dozarea lipidelor (b) și cantitatea de extract lipidic utilizată pentru purificarea lipidelor se calculează cantitatea lipidelor totale din creier în mg%, după formula

$$\% \text{ lipide totale} = \frac{a \times 25 \times 100}{10 \times b}.$$

Eroarea metodei este în medie de 1,5% (din 16 experiențe) și nu depășește în experiențe separate 2—3%.

Determinarea radioactivității lipidelor totale din creier. În scopul determinării activității specifice a lipidelor totale din creierul de șobolan, precipitatul lipidic obținut după dozarea cantitativă a lipidelor este dizolvat în 2—3 ml de mixtură cloroform-metanol (2 : 1) și soluția obținută transportată atent și repetat, în cantități mici, pe discuri de aluminiu (suprafață de 2,54 cm^2) în prealabil cîntărite, și evaporată la sec prin încălzire ușoară. Discurile cu precipitatul lipidic sînt din nou cîntărite după răcire. Diferența dintre greutatea discurilor cu și fără precipitatul lipidic este de obicei mai mică decît greutatea precipitatului lipidic din capsula de cîntărire. Acest fapt se explică prin aceea că precipitatul proteic, care se eliberează prin uscarea lipidelor din complexul proteolipidic, nu se dizolvă din nou în mixtura de cloroform-metanol și prin urmare nu influențează asupra dozării radioactivității lipidelor.

Dozarea radioactivității lipidelor totale s-a efectuat cu ajutorul contorului Geiger-Müller (2 mg/cm^2) de tipul T25-BFL la instalația B-2. Calculul activității specifice (imp/min/mg lipide) este identic cu cel efectuat de noi în lucrarea anterioară [5]. Calculul activității specifice relative

a lipidelor s-a efectuat după obținerea valorii activității specifice a unui mg de carbon lipidic. Pentru obținerea acestei valori este necesar să cunoaștem conținutul procentual al carbonului în lipidele cerebrale, ținînd seama de cantitatea diferiților reprezentanți lipidici în țesut și procentul de carbon al fiecărui reprezentant. Folosind datele experimentale obținute de H. H. Williams, H. Galbraith, M. Kaucher, I. G. Macy [15], H. H. Williams, H. Galbraith, M. Kaucher, E. Z. Moyer, A. J. Richard, I. G. Macy [16] precum și datele noastre expuse în partea experimentală asupra conținutului lipidelor totale în creierul animalelor mature, noi am calculat conținutul carbonului în lipidele cerebrale și l-am găsit egal cu 70%.

Pentru determinarea activității specifice (imp/min/mg C) ținem seama de valoarea activității specifice găsită experimental pentru 1 mg de lipide. Activitatea specifică a lipidelor la 1 g de țesut cerebral s-a efectuat ținînd seama de cantitatea lipidelor exprimată în mg%.

Pentru dozarea cantitativă a lipidelor totale din creier și pentru determinarea activității lor specifice am folosit în toate experiențele cîte 2 probe paralele.

Pentru a caracteriza viteza de refacere a diverșilor compuși biologici din creier se folosește foarte frecvent valoarea activității specifice relative, care reprezintă relația dintre activitatea specifică a compușilor studiați și activitatea specifică a sursei radioactive din care aceștia se sintetizează.

În experiențele noastre asupra vitezei de refacere a lipidelor totale din creierul șobolanilor maturi am utilizat acetat radioactiv, marcat pe gruparea carboxil cu ^{14}C. Încercările noastre de a doza cantitatea de acetat în țesutul cerebral după metoda Ciaranfi și Fonnesu [4] nu au dat rezultate pozitive. În lucrarea de față activitatea specifică relativă este arbitrar considerată relația activității specifice a lipidelor totale față de activitatea specifică a carbonului total din omogenatul țesutului cerebral.

Dozarea activității specifice a carbonului omogenatului cerebral. Probele de țesut egale cu 15—20 mg se recoltează în eprubete de centrifugă, în care s-au pipetat în prealabil 0,5—1 ml apă distilată. După 1—2 ore, cînd țesutul este bine îmbibat cu apă, conținutul eprubetei este transportat cantitativ pe discuri de aluminiu (2,54 cm^2) și uscat pînă la obținerea unei greutăți constante la temperatura de 100—105°C. Discurile răcite pînă la temperatura camerei sînt cîntărite din nou și se calculează cantitatea precipitatului omogenatului.

Activitatea specifică a omogenatului se exprimă în imp/min/mgC și imp/min/g, țesut cerebral. Pentru exprimarea activității specifice în imp/min/mg C al omogenatului este necesar să cunoaștem conținutul carbonului în țesutul cerebral. Ținînd seamă de conținutul în apă, proteine, lipide și glucide al creierului, precum și de conținutul procentual al carbonului în fiecare compus organic, am calculat conținutul carbonului total în omogenatul cerebral și l-am găsit egal cu 13% (valoare mai exactă 12,9%), valoare utilizată de noi în lucrarea de față.

REZULTATE

Rezultatele experimentale obținute de noi în experiențele asupra dozării cantitative a lipidelor totale din creierul animalelor mature după o oră de la administrarea preparatului radioactiv, sînt expuse în tabela 1.

După cum se vede din tabela 1 conținutul lipidelor totale din creier este relativ constant, variind de la 9,8% la 11% și fiind în medie egal cu 10,2 ± 0,26%. Comparînd greutatea animalului și conținutul în g% al lipidelor totale din creier, putem observa că pe măsura creșterii în greutate a animalului se mărește și cantitatea lipidelor. Totuși, datele experimentale de care dispunem nu ne dau posibilitatea unei afirmații mai categorice în acest sens.

Schimbări esențiale în conținutul lipidelor totale din creier nu s-au observat în experiențele a căror durată, după administrarea preparatului radioactiv de acetat de sodiu, a fost de 3 ore. Valoarea medie din 5 experiențe este egală cu 10,2 ± 0,2%.

Tabela 1

Conținutul lipidelor totale în creierul animalelor mature (exprimat în g%)

Nr. experienței	Greutatea animalului g	Conținutul lipidelor %
1	84	9,8
2	85 *)	9,9 *)
3	89	9,8
4	92	9,7
5	99	10,2
6	105 *)	10,0 *)
7	105	10,1
8	108 *)	10,4 *)
9	110	10,1
10	110	10,8
11	112	10,4
12	118 *)	10,2 *)
13	120	10,4
14	121	10,2
15	125 *)	10,5 *)
16	125	11,0

Valoarea medie 10,2±0,26

*) Dozarea cantitativă a lipidelor totale s-a efectuat pe animale sacrificate după 3 ore de la administrarea preparatului radioactiv.

Concomitent cu dozările cantitative ale lipidelor totale am studiat de asemenea și activitatea lor specifică, utilizînd în acest scop $CH_3—{}^{14}COONa$. Datele experimentale obținute asupra intensității refacerii lipidelor totale din creierul animalelor adulte, după o oră de la administrarea preparatului radioactiv (30 μc/100 g greutate) sînt expuse în tabela 2 și comparate cu activitatea specifică a carbonului total din omogenatul cerebral.

După cum se vede din tabela 2, activitatea specifică a lipidelor totale din creier în medie este egală cu 45 imp/min/mg C şi depăşeşte de 1,1 ori activitatea specifică a carbonului omogenatului care a fost egală cu 40 imp/min/mg C. Remarcăm de asemenea faptul că în 20 de

Tabela 2

Activitatea specifică a carbonului lipidelor totale şi omogenatului din creierul animalelor adulte după o oră de la administrarea acetatului radioactiv (30 μ c/100 g)

Nr. experienţei	Activitatea specifică imp/min/mg C		Activ. specifică a C lipide
	Omogenat	Lipide totale	Activ. specifică a C omogenatului
1	35	37	1,06
2	47	48	1,02
3	36	44	1,22
4	45	48	1,06
5	28	35	1,25
6	49	46	0,94
7	34	45	1,32
8	49	49	1,00
9	36	35	0,97
10	48	54	1,12
11	44	48	1,09
12	28	37	1,32
13	46	47	1,02
14	54	62	1,15
15	33	40	1,21
16	33	43	1,30
17	50	56	1,12
18	26	30	1,15
19	52	62	1,19
20	26	36	1,38
21	52	55	1,06
22	29	31	1,07
Media	40±8	45±7	1,13

experienţe, din cele 22 efectuate de noi, valoarea activităţii specifice relative a lipidelor totale din creierul animalelor adulte a fost mai mare ca unitatea. Activitatea specifică a lipidelor totale în restul de două experienţe este apropiată de unitate : 0,94 şi 0,97. Dacă activitatea specifică a carbonului total o considerăm convenţional 100%, atunci activitatea specifică relativă a lipidelor totale este de 112%.

Cercetîndu-se activitatea specifică a omogenatului şi lipidelor totale după 3 ore de la administrarea acetatului radioactiv, s-a constatat, după cum reiese din tabela 3, că activitatea specifică atît a carbonului omogenatului cît şi a lipidelor totale a scăzut simţitor în comparaţie cu valorile obţinute în experienţele a căror durată a fost de o oră. Astfel activitatea specifică a omogenatului constituie numai 70% din activitatea specifică a omogenatului cercetat după o oră, în timp ce aceea a lipidelor 71% din activitatea specifică a lipidelor care au fost dozate după o oră. Este

semnificativ faptul că, deşi valorile activităţii specifice au scăzut, valoarea activităţii specifice relative a lipidelor este totdeauna egală sau mai mare ca unitatea, în medie fiind de 1,02, ceea ce denotă că viteza de refacere a lipidelor totale din creier continuă să rămînă la un nivel înalt şi după 3 ore de la administrarea precursorului radioactiv (tabela 3).

Tabela 3

Activitatea specifică (imp/min/mg C) a lipidelor totale şi omogenatul cerebral după 3 ore de la injectarea $CH_3-{}^{14}COONa$ (30μ c/100 g)

Nr. experienţei	Activitatea specifică imp/min/mg C		Activitatea specifică a C lipidelor
	Omogenat	Lipide totale	Activitatea specifică a C omogenatului
1	26	27	1,03
2	29	28	0,96
3	28	30	1,07
4	31	31	1,00
5	25	26	1,04
	28±2	28±2	1,02

Datele experimentale expuse mai sus cu privire la viteza de refacere a lipidelor totale în creier sînt încă o dată confirmate prin compararea activităţii specifice a carbonului din omogenat cu activitatea specifică a lipidelor dintr-un gram de ţesut cerebral (tabela 4).

Tabela 4

Încorporarea carbonului radioactiv al $CH_3-{}^{14}COONa$ în omogenatul şi lipidele totale din creier, după o oră de la administrarea preparatului

Nr. experienţei	Activitatea specifică imp/min/g ţesut		Procentul încorporării carbonului radioactiv în lipidele totale
	Omogenat	Lipide totale	
1	6 000	4 800	80
2	6 240	4 500	72
3	6 370	4 750	76
4	4 550	3 700	81
5	6 100	4 700	77
6	5 850	4 700	80
7	6 370	4 600	72
8	4 680	3 565	76
9	3 750	3 100	82
10	6 150	4 850	79

Procentul încorporării carbonului radioactiv al acetatului în lipidele totale din creierul animalelor adulte, după o oră de la administrarea preparatului pe cale intraperitoneală, variază între 70—80% şi este în medie

de 77%. Cu toate că activitatea specifică a carbonului omogenatului cerebral şi lipidelor scade după o perioadă de 3 ore de la injectarea preparatului radioactiv, procentul de carbon radioactiv încorporat în lipidele cerebrale rămîne constant (tabela 5).

Tabela 5

Încorporarea carbonului radioactiv în omogenatul şi lipidele totale din creier după 3 ore de la administrarea preparatului radioactiv de acetat de sodiu

Nr. experienţei	Activitatea specifică imp/min/g ţesut		Procentul încorporării carbonului total radioactiv în lipidele totale
	Omogenat	Lipide totale	
1	3 380	2 680	78
2	3 785	2 880	74
3	3 640	2 938	80
4	4 030	3 000	76
5	3 245	2 600	80

Din experienţele expuse mai sus, rezultă că lipidele totale din creier posedă o viteză de refacere considerabilă, activitatea specifică a diferiţilor compuşi organici care intră în compoziţia ei fiind în general mai mare decît a altor componenţi ai ţesutului cerebral care se refac pe seama acetatului (proteine, glucide) [12].

DISCUTAREA REZULTATELOR ŞI CONCLUZII

H. H. Williams, H. Galbraith ş. a. [15], [16], M. I. Prohorova şi colaboratori [12], G. Brante [3] în cercetările asupra metabolismului lipidelor din creierul animalelor mature au găsit că lipidele totale formează 10,3—10,5%. În experienţele noastre cantitatea lipidelor cerebrale variază între 9,8 şi 11%, fiind în medie egală cu 10,2 ± 0,26%, înscriindu-se astfel pe linia datelor experimentale din literatură şi confirmînd posibilitatea folosirii metodei Folch şi colaboratori [8], [9] pentru dozarea cantitativă a lipidelor din creier.

Carbonul radioactiv al acidului acetic este intens utilizat de organismul animal pentru sinteza lipidelor (R. O. Brady şi S. Gurin [1], [2], J. T. Van Bruggen şi colaboratori [14], J. G. Coniglio, C. E. Anderson şi C. S. Robinson [5], G. Popyak, T. H. French şi H. Folley [10] ş.a.).

M. I. Prohorova şi colaboratori [11], [12] au arătat că aproximativ 50% şi respectiv 50—70% din totalul carbonului radioactiv al omogenatului cerebral sînt găsite în lipidele totale după o oră de la administrarea preparatului radioactiv. În experienţele expuse mai sus carbonul radioactiv al lipidelor totale constituie în medie 77—78% din totalul carbonului radioactiv din creier. Aceste experienţe sînt explicabile dacă ţinem seama de faptul că acidul acetic este un precursor activ folosit de

organism pentru sinteza lipidelor, iar carbonul lipidelor totale formează 54% din cantitatea totală de carbon din creier.

Pe lîngă deosebirea dintre valorile procentului de carbon radioactiv găsit în lipidele totale din creier de către noi şi alţi autori [11], [12], remarcăm şi faptul că în experienţele noastre valoarea activităţii specifice relative a lipidelor este de 112%, în timp ce în lucrările citate aceeaşi valoarea este găsită egală cu 71%.

Activitatea specifică ridicată a lipidelor totale se observă şi după 3 ore de la injectarea acetatului radioactiv (28 imp/min/mg C), activitatea specifică relativă a fracţiei fiind de 1,02. Pe baza datelor experimentale putem afirma că după 3 ore de la administrarea preparatului radioactiv de acetat de sodiu nu se observă schimbări semnificative în viteza de refacere a lipidelor totale. Procentul de carbon radioactiv descoperit în lipidele totale din creier este de 77%. J. T. Van Bruggen şi colaboratori [14] de asemenea nu au găsit modificări apreciabile în radioactivitatea lipidelor totale din creier, piele, ficat şi cordul spinal după 4 ore de la administrarea acidului acetic radioactiv.

Viteza de refacere relativ mare a lipidelor totale din creier după 1 şi 3 ore de la injectarea acetatului de sodiu radioactiv, demonstrată atît de activitatea specifică a acestora cît şi de procentul ridicat al carbonului radioactiv descoperit în lipidele totale, se datoreşte, probabil, vitezei de refacere considerabile cu care diferiţi compuşi lipidici care intră în compoziţia fracţiunii se refac din carbonul radioactiv al acetatului.

Molecula colesterolului cerebral se reface foarte încet din carbonul radioactiv al acidului acetic [12]. După 1 şi 3 ore de la administrarea acestuia nu se poate depista prezenţa carbonului radioactiv în colesterolul din creierul animalelor adulte.

N. P. Taranova [13] cercetînd viteza de refacere a gangliozidelor şi cerebrozidelor a arătat că acestea se refac mult mai încet decît lipidele totale şi prin urmare nu pot condiţiona viteza de refacere relativ mare a lipidelor din creierul animalelor mature. De aceea este natural să ne întrebăm datorită căror compuşi de natură lipidică fracţia lipidelor totale din creier posedă o asemenea activitate specifică ridicată.

Cercetările preliminare întreprinse de noi pentru studiul vitezei de refacere a diferiţilor componenţi de natură fosfolipidică din creierul animalelor mature au demonstrat că fracţiunea fosfatidilcolinei şi fosfatidiletanolaminei posedă o activitate specifică mare în cazul cînd în calitate de precursor este folosit acetatul radioactiv marcat pe gruparea carboxilică [7]. Expunerea detaliată a acestor experienţe constituie subiectul unei alte lucrări.

Prezentată la redacţie
la 21 august 1962

Catedra de biochimie,
Facultatea de ştiinţe naturale
a Universităţii din Bucureşti

БИОХИМИЯ МОЗГА

II. ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВА ФРАКЦИИ ОБЩИХ ЛИПИДОВ МОЗГА И СКОРОСТИ ИХ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

РЕЗЮМЕ

В опытах, проведенных на белых крысах, автор определял общее содержание липидов мозга и скорость их восстановления, используя с этой целью радиоактивный уксуснокислый натрий.

Было доказано, что общие липиды мозга, содержание которых колеблется от 9,8 до 11%, а в среднем равно 10,2%, восстанавливаются со значительной скоростью. Через час после введения $CH_3—{}^{14}COONa$, свыше 70% радиоактивного углерода, обнаруженного в мозговой ткани, содержится в общих липидах. Специфическая активность последних у взрослых особей (имп/мин/мг „C") превышает в 1,1 раза специфическую активность углерода гемогената мозга.

Изучая динамику восстановления общих липидов мозга через три часа после введения радиоактивного индикатора, автор заметил снижение радиоактивности углерода как в гемогенате, так и в общелипидной фракции. Относительная специфическая активность общих липидов остается все же равной единице или же больше ее.

Полученные результаты требуют изучения скорости восстановления (используя с этой целью радиоактивный углерод) различных компонентов, входящих в состав общелипидной фракции мозга.

BIOCHEMISTRY OF BRAIN

II. STUDIES ON THE QUANTITY AND THE RATE OF RECOVERING THE TOTAL LIPIDIC FRACTION OF BRAIN

ABSTRACT

In several experiments carried out on white rats, the author determined the quantity of total lipids in brain and their rate of recovering making use therefore of labelled sodium acetate, $CH_3—C^{14}OONa$.

He established that the total lipids, which represent from 9.8 to 11% of the brain, with an average value of 10.2%, exhibit a considerable rate of recovering. One hour after administering the labelled acetate more than 70% of the total radioactive carbon found in the cerebral tissue was incorporated in the total lipids. The specific activity of the latter in the brain of grown-up animals (imp./min./mg"C") exceeds 1.1 times the specific activity of the carbon in the brain homogenate.

Three hours after administering the radioactive indicator, an investigation of the dynamics of the restoration of total brain lipids enabled

the author to observe a decrease in the radioactivity of the carbon in the homogenate as well as in the total lipidic fraction. Notwithstanding this, the relative specific activity remained equal to or greater than the unity.

The results hitherto obtained suggest the necessity of further investigations with the aid of radioactive carbon on the rate of recovering of the various components of the total lipidic fraction of brain.

BIBLIOGRAFIE

1. BRADY R. O., GURIN S., *The biosynthesis of radioactive fatty acids and cholesterol.* J. Biol. chem., **186**, 461 (1950).
2. BRADY R. O., GURIN S., *The synthesis of radioactive cholesterol and fatty acids in vitro.* J. Biol. chem., **189**, 371 (1951).
3. BRANTE G., *Studies on lipids in the nervous system.* Acta physiol. Scand., **18**, suppl. 63 (1949).
4. CIARANFI E., FONNESU A., *Photometric micro-analytical estimation of acid acetic in blood and tissues.* Biochem. J., **50**, 698 (1952).
5. CONIGLIO J. C., ANDERSON C. E., ROBINSON C. S., *Acetate utilization in normal, fasting and pyruvate treated rats.* J. Biol. chem., **198**, 525 (1952).
6. DUMITRU I. F., *Influenţa cortizonului şi insulinei asupra dinamicii şi vitezei de reînnoire a colesterolului şi fracţiei lipidelor totale din ficat.* Studii şi cercet. biochimie, **4**, *2*, 431 (1959)
7. ДУМИТРУ И. Ф., *Скорость обновления отдельных компонентов фосфолипидов в головном мозгу.* В *Тезисы докладов конференции по вопросам гипоксии и биохимии нервной и мышечной систем.* Л., 1962.
8. FOLCH J., ASCOLI J., LEES M., MEATH J. A., LE BARON F. N., *Preparation of lipids extracte from brain tissue.* J. Biol. chem., **191**, 833 (1951).
9. FOLCH J., LEES M., SLOANE-STANLEY G. M., *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.* J. Biol. chem., **226**, 497 (1957).
10. POPYAK G., FRENCH T. H., FOLLEY H., *Utilization of acetate for milk-fat synthesis in the lactating goat.* Biochem. J., **48**, 411 (1951).
11. ПРОХОРОВА М. И., ТУПИКОВА З. Н., *Скорость обновления углеводов и липидов в головном мозгу и печени при возбуждении и наркотическом сне.* В *Вопросы биохимии нервной системы.* Изд. Академии наук УССР, Киев, 1957.
12. ПРОХОРОВА М. И., МАТВЕЕВА И. М., ПУТИЛИНА Ф. Е., СОКОЛОВА Г. П., *Скорость обновления некоторых пластических и энергетических веществ в головном мозгу.* Нервная система, вып. 2, 22 (1960),
13. ТАРАНОВА Н. П., *Интенсивность обмена цереброзидов и ганглиозидов мозга.* Вестник Ленинградского государственного университета, *2*, вып. 2, 114 (1961).
14. VAN BRUGGEN J. T., HUTCHENS T. T., CLAYCOMB C. K., WEST E. S., *Time course of lipide labelling in the intact mouse and rat.* J. Biol. chem., **200**, 31 (1953).
15. WILLIAMS H. H., GALBRAITH H., KAUCHER M., MACY I. G., *The influence of age and diet on the lipid composition of the rat.* J. Biol. chem., **161**, 463 (1945).
16. WILLIAMS H. H., GALBRAITH H., KAUCHER M., MOYER E. Z., RICHARD A. J., MACY I. G., *The effect of growth on the lipid composition of rat tissues.* J. Biol. chem., **161**, 475 (1945).

BIOCHIMIA CREIERULUI

III. STUDIUL VITEZEI DE REFACERE A FOSFOLIPIDELOR TOTALE ŞI PRINCIPALILOR COMPONENŢI FOSFOLIPIDICI DIN CREIER CU AJUTORUL CARBONULUI RADIOACTIV ^{14}C

DE

I. F. DUMITRU

În ultimii ani, un mare număr de cercetări au avut drept scop stabilirea relaţiilor dintre metabolismul fosfolipidelor din sistemul nervos central şi rolul pe care diferiţi componenţi fosfolipidici îl joacă, fără îndoială, în activitatea funcţională a creierului. Cercetătorii sovietici au demonstrat legătura indisolubilă dintre metabolismul fosfolipidic şi starea funcţională a creierului [13], [16], [17], [26].

Schimbări semnificative în metabolismul fosfolipidelor din creier au fost arătate şi în cazul diferitelor acţiuni asupra organismului ca hipoxia, hipotermia, acţiunea iradiaţiilor şi altele [1], [10].

Marea majoritate a cercetărilor dedicate studiului metabolismului fosfolipidic din creier au fost efectuate, aproape exclusiv, cu ajutorul izotopului radioactiv al fosforului ^{32}P, iar concluziile asupra modificărilor metabolice erau formulate pe baza analizei vitezei de refacere a fracţiunii fosfolipidelor totale, cu toate că diferiţi reprezentanţi ai acestei fracţiuni se refac în mod diferit [2], [3], [5], [10], [13].

L. E. Hokin şi M. R. Hokin [12], H. I. Ybema şi B. Leiynse [27], A. A. Smirnov, E. V. Cirkovskaia, K. G. Manukian [23], E. M. Kreps şi colaboratori [14] au obţinut date contradictorii cu privire la intensitatea metabolismului diferiţilor componenţi fosfolipidici din creier în cazul utilizării ca indicator radioactiv a ^{32}P.

În vederea cunoaşterii mai aprofundate a vitezei de refacere a diferiţilor componenţi fosfolipidici ne-am propus să studiem intensitatea metabolismului lor folosind carbon radioactiv ^{14}C sub formă de $CH_3{}^{14}COONa$.

Utilizarea carbonului radioactiv ^{14}C, sub formă de acetat de sodiu, marcat la gruparea carboxilică, este condiționată de faptul că în literatură nu am găsit nici o indicație în legătură cu biosinteza fosfolipidelor din creier din precursori cu ^{14}C. Singura lucrare cu carbon radioactiv în studiul componenților fosfolipidici, însă din sîngele uman, aparține lui C. E. R o w e [22]. Scheletul moleculei fosfolipidice fiind în principal format din atomii de carbon ai glicerinei, acizilor grași, bazelor azotate, serinei și nucleului inozitolic, cercetările cu carbon radioactiv capătă astfel o importanță deosebită.

În primul rînd ne-a interesat faptul că *in vivo* lipidele totale posedă o viteză de refacere considerabilă în cazul folosirii acetatului radioactiv marcat cu ^{14}C [8], [19], cu toate că biosinteza gangliozidelor, cerebrozidelor și colesterolului, componenți lipidici care intră în compoziția acestora nu pot explica metabolismul intens al lipidelor totale din creier [25], [24].

Totodată ne-a reținut atenția și un alt aspect, acela că fosfolipidele formează mai mult de jumătate din conținutul lipidelor totale din creier și analiza vitezei lor de refacere va arăta în ce măsură prezența lor în lipidele totale condiționează viteza de refacere relativ mare a lipidelor.

Într-o a doua fază a lucrării ne-am propus să analizăm cantitatea diferiților componenți de natură fosfolipidică în țesutul cerebral, precum și intensitatea metabolismului fiecărui component, utilizînd în acest scop fracționarea pe coloană de silicagel a extractului fosfolipidic radioactiv.

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele s-au efectuat pe șobolani albi în greutate de 80—120 g. Acetatul de sodiu, marcat cu ^{14}C la gruparea carboxilică, s-a injectat animalelor subcutanat, 30 μc la 100 g greutate. După o oră de la administrarea preparatului radioactiv animalele au fost sacrificate prin introducere în aer lichid. Creierul a fost extras repede din cavitatea cranială, curățat de membranele aderente și vasele sanguine mari, după îndepărtarea prealabilă a cerebelului. Creierii a 3—4 șobolani au fost reuniți în stare congelată, mojarați atent pînă la obținerea unei pulberi amorfe, albe — perfect omogene — omogenatul țesutului cerebral.

Au fost determinați următorii parametrii biochimici : 1) cantitatea fosfolipidelor din creier ; 2) conținutul diferiților componenți fosfolipidici obținuți în urma cromatografiei pe coloană de silicagel a extractului fosfolipidic din creier ; 3) activitatea specifică a lipidelor totale (imp/min/mg C lipidic) ; 4) activitatea specifică a diferiților compuși fosfolipidici (imp/min/mg C component fosfolipidic) și 5) activitatea specifică relativă a diferiților compuși fosfolipidici obținuți după fracționarea pe coloană de silicagel.

Determinarea activității specifice a lipidelor totale s-a făcut exact după metoda descrisă anterior [8].

Cromatografia pe coloană de silicagel a extractului fosfolipidic din creier a necesitat utilizarea următorilor reactivi : cloroform pur — 450 ml ;

cloroform-metanol (4 : 1) – 500 ml ; cloroform-metanol (3 : 2) – 750 ml ; cloroform-metanol (1 : 4) – 500 ml. De asemenea metoda obținerii extractului fosfolipidic și alte procedee metodice sînt descrise detaliat într-o lucrare publicată anterior [7].

Identificarea diferiților componenți fosfolipidici obținuți în urma cromatografiei pe coloană de silicagel a extractului fosfolipidic din creier s-a efectuat atît prin comparații cu datele din literatură [6], [9], [21], [23] cît și prin reacțiile de culoare.

Fracțiunile fosfolipidice, obținute după cromatografia extractului fosfolipidic total din creier pe coloană de silicagel, sînt concentrate prin evaporare pe o baie de apă (60—65°C) pînă la obținerea unui volum mic de soluție (5 ml), care conține însă apreciabile cantități de fosfor fosfolipidic. Soluția obținută după evaporare este supusă apoi analizei cromatografice calitative. Se folosește hîrtie Whatman nr. 1 sau Schleicher și Schull nr. 2043. Pe hîrtia cromatografică se aplică 0,015—0,04 ml soluție (5—15 γ fosfor), se usucă la temperatura camerei și apoi se folosește pentru reacția calitativă. Pentru fiecare fracțiune în parte au fost efectuate următoarele reacții :

Reacția cu rhodamine 6-G este o reacție generală pentru toate lipidele. Hîrtia cromatografică, pe care în prealabil a fost aplicată fracțiunea cercetată, se introduce timp de 10 min într-o baie ce conține soluție rhodamine 6-G 0,001 %, se spală cu apă distilată timp de 5 min și se privește în ultraviolet, folosind în acest scop ultrachimiscopul Brumberg UB-1.

Reacția cu Rhodamine B-extra este în multe privințe asemănătoare cu reacția descrisă mai sus. Pentru reacțiile calitative s-a folosit o soluție de rhodamine B-extra 0,02 % și spoturile au fost privite în ultraviolet la ultrachimiscopul UB-1.

Reacția cu acid fosfomolibdic. Cromatogramele proaspăt preparate sau după prelucrarea cu ninhidrină sînt introduse într-o baie care conține soluție apoasă de acid fosfomolibdic 2 %. După 30 s cromatogramele se spală, cel puțin 45 min, cu apă distilată și apoi se introduc într-o soluție de $SnCl_2$ 2 % proaspăt preparată în HCl 2,5 N.

Reacția cu ninhidrină. Cromatogramele au fost pulverizate cu soluție de ninhidrină 0,3 % în n-butanol, spălate cu apă distilată și apoi uscate în termostat, timp de 10 min la 80—100°C.

Pe baza reacțiilor calitative descrise mai sus, folosite de noi și comparînd rezultatele noastre cu datele experimentale obținute de D. N. Rhodes și R. M. C. Dawson [21], G. V. Marinetti și E. Stotz [15], A. A. Smirnov, E. V. Circovskaia, K. G. Manuchian [23], am ajuns la concluzia că fracțiunea I reprezintă acizii fosfatidici (spoturile ei pe hîrtia cromatografică sînt colorate de rhodamine 6-G în purpur, de rhodamine B-extra în albastru și nu dau reacții de culoare cu alți coloranți) ; fracțiunea II corespunde fosfatidiletanolaminei, spoturile ei dau o reacție pozitivă cu ninhidrina și o culoare galben-oranj cu rhodamine 6-G și rhodamine B-extra ; fracțiunea III — mult mai complexă ca compoziție decît fracțiunile anterioare — corespunde probabil serinfosfolipidelor, difosfoinozitidelor și, posibil, acetalfosfolipidelor (dă o reacție pozitivă cu ninhidrina, o culoare purpur cu rhodamine 6-G și spoturi colorate în albastru pe margini și galben-oranj

în centru cu rhodamine B-extra); fracțiunea IV corespunde fosfatidilcolinei (lecitinelor) (reacția cu rhodamine 6-G și rhodamine B-extra dă spoturi galben-oranj, spoturi de culoare albastră cu acidul fosfomolibdic și reacție negativă cu ninhidrina) și în sfîrșit fracțiunea V care corespunde sfingomielinei (spoturi de culoare galben-oranj cu rhodamine 6-G și rhodamine B-extra și reacția pozitivă pentru colină cu acid fosfomolibdic și $SnCl_2$).

Pentru cercetarea activității specifice a diferiților componenți fosfolipidici obținuți în urma cromatografiei extractului fosfolipidic pe coloană de silicagel, fracțiunile obținute au fost concentrate prin evaporare pe o baie de apă și în soluția obținută fosforul a fost dozat din nou. Probe cu un volum și conținut în fosfor binecunoscut au fost aplicate pe discuri de aluminiu standard și evaporate la sec în termostat, la 35—40°C.

Radioactivitatea a fost dozată cu ajutorul instalației B-2 folosind un contor Geiger-Müller de tipul T-25 BFL, 2 mg/cm^2.

Activitatea specifică a diferiților componenți s-a calculat pentru 1 mg carbon substanță de cercetat. Activitatea specifică relativă a fracțiunilor fosfolipidice II, III, IV și V și a lipidelor neutre s-a calculat din relația:

$$\frac{\text{Activitatea specifică a carbonului fracțiunii cercetate}}{\text{Activitatea specifică a carbonului lipidelor totale}},$$

unde activitatea specifică a carbonului lipidelor totale, este considerată arbitrar 100%.

Calculele activității specifice (imp/min/mg C) pentru fracțiunile fosfolipidice II-V și lipidelor neutre s-au efectuat luînd în considerație activitatea specifică a fiecărei fracțiuni fosfolipidice—imp/min/mg substanță găsită experimental — și ținînd cont de faptul că conținutul carbonului în fracțiunea fosfolipidelor totale este de 65,9%, în fracțiunea fosfatidilcolinei 65,3%, în sfingomieline 66,7%, în fracțiunea fosfatidiletanolaminei conținutul carbonului este de 65,8%, în lipidele neutre 77,4%. Activitatea specifică a fracțiunii III — serinfosfolipide, difosfoinozitide și probabil acetalfosfolipide— a fost calculată convențional, considerînd că conținutul carbonului în această fracțiune este de 56%.

REZULTATE

Dozarea cantitativă a fosfolipidelor în creier. Conținutul fosfolipidelor totale din creierul șobolanilor maturi este relativ constant și egal cu 5,6±0,4%, în experiențele în care pentru dozările cantitative ale fosfolipidelor a fost utilizat extractul fosfolipidic din creier obținut după metoda Vladimirov, Ivanova și Rubel [26].

Folosirea cromatografiei pe coloană de silicagel cu scopul separării diferiților reprezentanți ai fosfolipidelor cerebrale a permis fracționarea acestora în cinci fracțiuni diferite, dîndu-ne posibilitatea să determinăm conținutul fiecărei fracțiuni în țesutul cerebral. În tabela 1 sînt expuse datele experimentale asupra conținutului fiecărei fracțiuni din creier, obținute în urma cromatografiei pe coloană de silicagel a extractului fosfolipidic.

După cum se vede din datele prezentate în tabela 1, fosfatidilcolina și fosfatidiletanolamina sînt componenții fosfolipidici de bază care intră în compoziția fosfolipidelor totale din creier, suma lor reprezentînd

Tabela 1

Conținutul diferitelor fracțiuni fosfolipidice în creierul animalului adult calculat, după fracționarea extractului fosfolipidic pe coloană de silicagel (exprimat în % țesut cerebral proaspăt)

Nr. experienței	Fracțiunea				
	Acizi fosfatidici (I)	Fosfatidil-etanolamină (II)	Fosfatidilserină, difosfoinozitide, acetalfosfolipide (III)	Fosfatidil-colină (IV)	Sfingo-mielină (V)
1	0,16	1,42	1,31	2,38	0,24
2	0,11	1,02	0,86	2,38	0,48
3	0,28	1,18	1,29	2,38	0,32
4	0,13	1,02	1,51	2,10	0,27
5	0,08	1,13	1,33	2,48	0,38
6	0,09	1,02	1,18	2,60	0,59
7	0,07	1,03	1,25	2,46	0,65
8	0,10	1,25	1,29	2,52	0,22
9	0,11	1,07	1,56	2,44	0,32
10	0,06	1,08	1,40	2,48	0,43
11	0,12	1,05	1,11	2,40	0,70
12	0,12	0,98	0,98	2,70	0,65
Valori medii	0,119±0,035	1,142±0,107	1,256±0,150	2,444±0,095	0,430±0,145

mai mult de 2/3 din totalul fosforului dozat după cromatografia pe coloană. Trebuie să remarcăm îndeosebi conținutul bogat al țesutului cerebral în fosfatidilcolină (lecitină) care este în medie egal cu 2,44%.

Conținutul fracțiunii sfingomielinelor (V) — fosfolipide ce conțin de asemenea colină — este de 0,4%, depășind în ceea ce privește cantitatea numai fracțiunea acizilor fosfatidici (I), care este reprezentată de aproximativ 2,1% din fosforul fosfolipidic total, conținutul ei în creier fiind de 0,12%.

În țesutul cerebral fracțiunea III — serinfosfolipidele, difosfoinositidele și posibil acetalfosfolipidele — este bogat reprezentată, conținutul ei fiind în medie de 1,25%. Marea majoritate a acestei fracțiuni este totuși formată din serinfosfolipide și forma acetalică a acestora, deoarece după cum a arătat R. M. C. Dawson [6] cantitatea fosfoinozitidelor în creier este relativ mică.

Cantitatea totală de fosfolipide din creier, determinată în urma dozării fiecărei fracțiuni fosfolipidice obținute după cromatografia extractului fosfolipidic pe coloană de silicagel, este de 5,47% și oarecum contravine celei determinate direct în extractul fosfolipidelor din creier (5,6 ± 0,4%).Experiențele lui J. Etienne și J. Polonovski [9] și M. Paysant-Diament și J. Polonovski [18] au demonstrat însă că o parte neînsemnată din fosforul fosfolipidic, aproximativ

2% din P fosfolipidelor, rămîne adsorbită pe coloana de silicagel în cazul folosirii schemei de eluție arătată mai sus. Acest fosfor, care după părerea autorilor sus citați aparține lizolecitinelor, este eluat din coloana de silicagel cu ajutorul soluției de metanol pur, reactiv neutilizat în experiențele noastre.

Studiul vitezei de refacere a fosfolipidelor totale, diferitelor fracțiuni fosfolipidice și a lipidelor neutre. Pentru studiul vitezei de refacere a fosfolipidelor totale am utilizat o parte din extractul fosfolipidic din creier pentru obținerea de fosfolipide pure, îndepărtarea colesterolului și eterilor săi precum și a lipidelor neutre efectuîndu-se cu ajutorul cloroformului pur. Eluția coloanei a decurs după schema : cloroform pur — 100 ml; cloroform-metanol (4 : 1) — 50 ml; cloroform-metanol (3 : 2) — 70 ml; cloroform-metanol (1 : 4) — 30 ml, eluatele cu excepția celui cloroformic colectîndu-se împreună.

În scopul stabilirii dinamicii metabolismului diferitelor fracțiuni fosfolipidice am utilizat eluatele fracțiunilor II—V. De asemenea s-a analizat și dozat radioactivitatea eluatelor cloroformice, care conțineau lipide neutre. Rezultatele obținute de noi sînt expuse în tabelele 2 și 3.

Tabela 2

Activitatea specifică a fosfolipidelor totale, lipidelor neutre și lipidelor totale din creier

Nr. experienței	Activitatea specifică (imp/min/mg C)		
	Lipide totale	Fosfolipide	Lipide neutre
1	35	57	57
2	40	60	75
3	47	64	78
4	45	52	59
5	35	—	67
6	36	—	62
7	43	—	58
8	30	—	70
9	31	—	72
10	44	—	68
	38±5	58±2,5	66±2

După cum se vede din tabela 2, activitatea specifică a fosfolipidelor totale este de 58 ± 2,5 imp/min/mg C, fiind mai ridicată decît activitatea specifică a lipidelor totale din creier 38 ± 5 imp/min/mg C și depășind de 1,6 ori activitatea specifică a ultimelor.

Lipidele neutre eluate cu ajutorul cloroformului pur posedă de asemenea o activitate specifică mare 66 ± 2 imp/min/mg C, ceea ce denotă că aceste lipide, care nu conțin fosfor, își refac molecula lor utilizînd carbonul radioactiv al acetatului marcat.

În tabela 3 este redată activitatea specifică a fracțiunilor fosfolipidice II—IV pentru 1 mg substanță și mg C.

Dintre fracțiunile cercetate cea mai mare activitate o posedă fracțiunea IV—fosfatidilcolinele, a căror activitate specifică este de 49 imp/min/mg substanță și 74 imp/min/mg C, urmată de fracțiunea

Tabela 3

Activitatea specifică a diferiților componenți fosfolipidici din creierul animalelor adulte, după o oră de la administrarea $CH_3{}^{14}COONa$

Nr. experienței	Fracțiunea							
	(IV) Fosfatidil-colină		(II) Fosfatidil-etanolamină		III) Serinfosfolipide, difosfoinozitide		(V) Sfingomieline	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
1	50	77	48	73	38	68	0	0
2	39	60	42	64	24	43	0	0
3	48	74	38	58	32	57	7	10
4	52	80	49	74	26	46	0	0
5	46	70	40	61	28	50	0	0
6	52	80	39	59	30	54	0	0
7	50	77	43	65	25	45	8	12
8	46	70	44	67	32	57	0	0
9	51	78	42	64	29	52	0	0
10	49	75	43	65	31	51	5	8
	49±3,1	7,4±1	43±2,6	65±2	29±3,1	52±2	—	—

(1) Activitatea specifică exprimată în imp/min/mg substanță.
(2) Activitatea specifică exprimată în imp/min/mg C.

II—fosfatidiletanolamina, a cărei activitate specifică este de 43 imp/min/mg substanță și 65 imp/min/mg C. Acești doi componenți fosfolipidici, care după cum s-a arătat formează marea majoritate a fosfolipidelor totale din creier, posedă și viteze de refacere relativ mari în comparație cu lipidele totale, fracțiunea III și sfingomielinele.

Fracțiunea sfingomielinelor în creierul animalelor adulte, la o oră după administrarea preparatului radioactiv de acetat de sodiu, se reface extrem de încet, numai în 3 experiențe putîndu-se determina prezența carbonului radioactiv în molecula sfingomielinelor.

În ceea ce privește fracțiunea III—serinfosfolipidelor, difosfoinozitidelor și acetalfosfolipidelor, activitatea ei specifică este de 29 imp/min/mg substanță și 52 imp/min/mg carbon.

Activitatea specifică a componenților fosfolipidici cercetați într-un gram de țesut cerebral pune în evidență faptul că viteza de refacere a fosfolipidelor totale din creier formează în medie 84% din activitatea specifică a lipidelor totale.

Comparînd activitatea specifică a fracțiunilor fosfolipidice II, III și IV cu activitatea specifică a lipidelor totale, se constată că un procent însemnat din activitatea specifică a acestora este format de fosfatidilcoline 48%, acestea fiind urmate de fracțiunile fosfatidiletanolaminei 19% și fracțiunea fosfatidilserinei, difosfoinozitidelor și acetalfosfolipidelor 17%. Lipidele neutre, care de asemenea posedă o activitate

specifică ridicată — 66 imp/min/mg C — formează numai 5,6% din activitatea specifică a lipidelor totale (tabela 4).

Viteza de refacere a diferitelor fracțiuni fosfolipidice este încă o dată evidențiată prin compararea activității lor specifice — imp/min/g țesut — cu activitatea specifică a fosfolipidelor totale din țesutul cerebral. Rezultatele date în tabela 4 confirmă această afirmație.

Tabela 4

Activitatea specifică (imp/min/g țesut) a diferitelor fracțiuni fosfolipidice în comparație cu activitatea specifică a lipidelor totale și fosfolipidelor totale din creierul șobolanilor adulți

Denumirea fracției	Activitatea specifică imp/min/g țesut	Activitatea specifică în % față de activitatea fracției lipidelor totale	Activitatea specifică în % față de fosfolipidele totale
Fracția lipidelor totale	3 880	100	—
Fracția fosfolipidelor totale	3 240	84	100
Lipide neutre	220	5,6	—
Fosfatidiletanolamină	745	19	23
Fosfatidilcolină	1 860	48	20,6
Fosfatidilserină, difosfoinozitide și acetalfosfolipide	670	17	57,4

Pentru a obține o imagine cît mai completă asupra vitezei de refacere a diferitelor fracțiuni fosfolipidice, fosfolipidelor totale și lipidelor neutre, am utilizat de asemenea și valoarea activității specifice relative.

În acest caz activitatea specifică a lipidelor totale a fost convențional considerată 100% și au fost utilizate valorile medii ale activității specifice a componenților comparați.

Cea mai mare activitate specifică relativă o posedă fosfatidilcolina 194%, urmată de lipidele neutre 172% și fosfatidiletanolamina, a cărei activitate specifică relativă este de 171%. În continuare, ca viteză de refacere, urmează fosfolipidele totale care posedă o activitate specifică relativă egală cu 153% și apoi fracțiunea fosfatidilserinei, difosfoinozitidelor și probabil acetalfosfolipidelor cu o activitate specifică relativă mai mică — 132%. Pentru fracțiunea sfingomielinelor activitatea specifică relativă este neînsemnată.

DISCUȚII

Rezultatele obținute de noi în dozarea cantitativă a fosfolipidelor din creier corespund cu cele obținute recent de F. D. Collins și V. L. Shotlander [4] iar rezultatele cu privire la conținutul diferitelor fracțiuni fosfolipidice (II, IV și V) în creierul animalelor adulte sînt apropiate de cele din literatură [6], [23].

Problema vitezei de refacere a lipidelor totale din creier din carbonul radioactiv ^{14}C al acetatului a fost cercetată de M. I. Prohorova și Z. N. Tupicova [19], M. I. Prohorova și colaboratori [20], I. F. Dumitru [8] și alții, care au observat că lipidele totale din creier posedă o radioactivitate considerabilă, după o oră de la administrarea acetatului radioactiv mai mult de 70% din totalul carbonului radioactiv al țesutului cerebral fiind descoperit în această fracțiune.

Pentru elucidarea problemei pe seama căror componenți lipidici, lipidele totale se refac cu o asemenea viteză mare, G. P. Sokolova [24] a cercetat viteza de refacere a colesterolului din creierul animalelor adulte și a observat că molecula colesterolului se reface deosebit de încet din carbonul radioactiv al acetatului. N. P. Taranova [25] a cercetat de asemenea viteza de refacere a cerebrozidelor și gangliozidelor, demonstrînd că acești compuși de natură lipidică se refac mult mai încet decît lipidele totale din creier.

Rezultatele obținute de noi și expuse în lucrarea de față au demonstrat că acetatul de sodiu marcat cu ^{14}C pe gruparea carboxilică este utilizat de țesutul cerebral pentru sinteza lipidelor neutre și a diferitelor fracțiuni fosfolipidice, explicînd astfel, în bună parte, pe seama căror compuși de natură lipidică, lipidele totale posedă o viteză de refacere mare.

Dintre toate fracțiunile fosfolipidice obținute și identificate, cea mai mare viteză de refacere o posedă două fracțiuni — fosfatidilcolina și fosfatidiletanolamina — care sînt abundent reprezentate în creier, cantitatea lor formînd mai mult de jumătate din cantitatea fosfolipidelor totale din țesutul cerebral. Viteza mare de refacere ca și cantitățile însemnate ale acestor două fracțiuni fosfolipidice prezente în țesutul cerebral sînt condiționate, probabil, de faptul că acești compuși de natură lipidică au, fără îndoială, un rol important în activitatea funcțională a creierului.

Viteza de refacere a difosfoinozitidelor din creier, care în experiențele noastre cu carbon radioactiv a fost găsită inferioară fosfatidilcolinei și fosfatidiletanolaminei, este probabil micșorată artificial de prezența în această fracțiune (III) a fosfatidilserinelor. H. /I. Ybema și B. Leiynse [27] au demonstrat că viteza de refacere a fosfatidilserinelor în experiențele cu ^{32}P este mult inferioară tuturor fracțiunilor fosfolipidice.

Fracționarea pe coloană de silicagel a extractului fosfolipidelor din creier și analiza ulterioară a activității specifice a fracțiunilor obținute a permis stabilirea ordinei în care diferiți reprezentanți fosfolipidici își refac molecula. Ordinea este următoarea: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, lipidele neutre, fosfolipidele totale, — serinfosfatidele, difosfoinozitidele și acetalfosfolipidele — și sfingomielinele. Această ordine de refacere a moleculei fosfolipidelor reamintește oarecum ordinea stabilită de L. E. Hokin și M. R. Hokin [12], G. E. Vladimirov și colaboratori [26], H. I. Ybema și B. Leiynse [27], A. A. Smirnov, E. V. Cirkovskaia și K. G. Manukian [23] care au folosit fosfor radioactiv ^{32}P.

CONCLUZII

Utilizînd cromatografia pe coloană de silicagel s-a stabilit conținutul diferitelor fracțiuni fosfolipidice în creierul animalelor adulte. Astfel, conținutul fosfatidilcolinei este de 2,44%, al fosfatidiletanolaminei 1,14%, sfingomielinelor 0,40%, acizilor fosfatidici 0,12%. Conținutul fracțiunii III — fosfatidilserină, difosfoinozitide și acetalfosfolipide — este de 1,29%.

Țesutul cerebral utilizează intens, *in vivo*, carbonul radioactiv din $CH_3{}^{14}COONa$ pentru sinteza diferiților compuși organici și în special pentru biosinteza lipidelor.

Viteza mare de refacere a lipidelor totale din creier este condiționată de prezența în această fracțiune a fosfatidilcolinei, fosfatidilserinei, difosfoinozitidelor și fosfatidiletanolaminei, care posedă o viteză de refacere însemnată. Radioactivitatea fosfolipidelor totale, după îndepărtarea în prealabil a impurităților de natură nefosfolipidică, formează aproximativ 80% din radioactivitatea lipidelor totale din creierul animalelor adulte.

Dintre fracțiunile fosfolipidice cercetate, cea mai mare viteză de refacere a fost observată în cazul fosfatidilcolinei și fosfatidiletanolaminei, urmate de fracțiunea complexă compusă din fosfatidilserină, difosfoinozitide și acetalfosfolipide.

Fracțiunea sfingomielinelor, după o oră de la administrarea acetatului radioactiv, se reface foarte încet, numai în trei cazuri putîndu-se demonstra prezența carbonului radioactiv în această fracțiune.

Prezentată la redacție
la 21 august 1962

Catedra de biochimie,
Facultatea de științe naturale
a Universității din București

БИОХИМИЯ МОЗГА

III. ИЗУЧЕНИЕ СКОРОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ ФОСФОЛИПИДОВ И ГЛАВНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ СОСТАВЛЯЮЩИХ МОЗГА ПРИ ПОМОЩИ РАДИОАКТИВНОГО УГЛЕРОДА ^{14}C

РЕЗЮМЕ

Автор рассматривает динамику обмена нейтральных липидов, общего содержания фосфолипидов, а также различных фосфолипидных составляющих мозга, как например фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина, сфингомиэлина и др.

Исследования проводились на взрослых крысах, весом в 80—120 г. За час до смерти животным давали 30 μг С на 100 г веса. Для получения общего содержания чистых фосфолипидов и различных фосфолипидных компонентов применялось хроматографирование на колонке силика-

геля фосфолипидного экстракта мозга. В результате фракционирования этого экстракта были получены следующие фракции: нейтральные липиды; фосфатидные кислоты; фосфатидилэтаноламин; фракция, состоящая из фосфатидилсерина, дифосфоинозитидов и, вероятно, ацеталфосфолипидов; фосфатидилхолин и сфингомиэлин. Фракции идентифицировали после хроматографирования на колонке силикагеля фосфолипидного экстракта мозга путем качественного хроматографирования на бумаге и цветных реакций с Родамином 6G, Родамином B-экстра, фосфор молибденовой кислотой и нингидрином.

Анализ специфической активности исследованных фракций дал следующие результаты:

а) специфическая активность общих фосфолипидов мозга значительна; на ее долю приходится около 80 % специфической активности общего содержания липидов;

б) среди всех изученных фосфолипидных составляющих сравнительно большую специфическую активность наблюдали у фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина. Фракция, состоящая из фосфатидилсерина, дифосфоинозитидов и ацетанфосфолипидов, обладает меньшей специфической активностью, чем вышеуказанные фракции. Сфингомиэлины мозга восстанавливаются гораздо медленнее из радиоактивного ацетата, через час после его введения; лишь в трех случаях удалось выявить наличие радиоактивного углерода в данной фракции.

в) Фракция нейтральных липидов, экстрагированных вместе с фосфолипидами из мозговой ткани, также восстанавливается из радиоактивного углерода уксуснокислого натрия.

BIOCHEMISTRY OF BRAIN

III. A STUDY ON THE RATE OF RECOVERING THE TOTAL PHOSPHOLIPIDS AND OF THE MAIN PHOSPHOLIPIDIC CONSTITUENTS OF BRAIN, BY MEANS OF RADIOACTIVE CARBON, ^{14}C

ABSTRACT

The author examines the dynamics of the metabolism of neutral lipids, total phospholipids and various phospholipidic constituents of brain, such as phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, sphingomyeline and others.

The experiments were carried out on grown-up rats weighing, between 80 and 120 g. One hour before being killed the animals received 30 μC per 100 g weight. Chromatography of the phospholipidic brain extract on a silica gel column was used in order to obtain the pure total phospholipidic fraction as well as various representative phospholipids.

As a result of this fractionation following fractions were obtained; neutral lipids; phosphatidic acids; phosphatidylethanolamine; a fraction

consisting of phosphatidylserine, diphosphoinositids and, probably, acetal-phospholipids; phosphatidylcholine; and sphingomyeline. The identification of the fractions obtained after the chromatography on silica gel column of the phospholipidic extract of brain was carried out by qualitative paper chromatography and by the use of coloration reactions with Rhodamine 6 G, Rhodamine B extra, phosphomolybdic acid and ninhydrine.

An analysis of the specific activity of the fractions investigated enabled the author to establish the following facts:

a) The specific activity of the total phospholipids of the brain is considerable, amounting to about 80% of the specific activity of total lipids.

b) Among the phospholipidic components investigated, relatively great specific activity was observed in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. The fraction made up of phosphatidylserine, diphosphoinositids and acetal-phospholipids shows a less specific activity than the above-mentioned fractions. Brain sphingomyelines are much slower recovered from radioactive acetate, as shown by values obtained an hour after administering the labelled salt; only in three instances could the C^{14} isotope be found out in this fraction.

c) The neutral lipids extracted from brain tissue together with the phospholipids, are also recovered using the radioactive acetate.

BIBLIOGRAFIE

1. ANSEL G. B., DOHMEN H., *The depression of phospholipid turnover in brain tissue by chloropromazine*. J. Neurochem., *1*, 150 (1956).
2. AUGUST C., DAVIDSON A. H., MAURICE-WILLIAMS F., *Phosphorus metabolism in nervous tissue. 4. Incorporation of ^{32}P into the lipids of subcellular fractions of the brain.* Biochem. J., **81**, 8 (1961).
3. CHANGUS G. W., CHAIKOFF I. L., RUBEN S., *Radioactive phosphorus as an indicator of phospholipid metabolism IV. The phospholipid metabolism of the brain.* J. Biol. Chem., **126**, 493 (1938).
4. COLLINS F. D., SHOTLANDER V. L., *Studies on phospholipids 7. The distribution of complex phospholipids in various species and tissues.* Biochem. J., **79**, 315 (1961).
5. DAWSON R. M. C., *The incorporation of labeled phosphate into the lipids of the brain dispersion.* Biochem. J., **55**, 507 (1953).
6. DAWSON R. M. C., *A hydrolitic procedure for the identification and estimation of individual phospholipid in biological samples.* Biochem. J., **75**, 45 (1960).
7. DUMITRU I. F., *Biochimia creierului I. Separarea fosfolipidelor din creier pe coloană de silicagel. Determinarea vitezei de refacere a diferiților componenți fosfolipidici folosind izotopi radioactivi (^{14}C).* Studii și cerc. biochimie, **5**, *3* (1962).
8. DUMITRU I. F., *Biochimia creierului II. Studii asupra cantității și vitezei de refacere a lipidelor totale din creier.* Studii și cercetări biochimie, acest volum.
9. ETIENNE J., POLONOVSKI J., *Evolution des lipides au cours de l'incubation du sérum. III. Etude des phospholipides.* Bull. Soc. Chem. biol., **42**, 857 (1960).
10. ГАСТЕВА С. В., ЧЕТВЕРИКОВ Д. А., *Интенсивность обмена фосфолипидов в центральной нервной системе крыс при острой лучевой болезни.* Доклады Академии Наук СССР, **142**, 1180 (1962).
11. GRAY G. M., MACFARLANE M. G., *Composition of phospholipids of rabbit, pigeon and trout muscle and various pig tissues.* Biochem. J., **81**, 480 (1961).
12. HOKIN L. E., HOKIN M. R., *The prezence of phosphatidic acid in animal tissues.* J. Biol. chem., **233**, 800 (1958).

13. Е. М. Крепс, А. А. Смирнов, Д. А. Четвериков, *Новые данные по сравнительному изучению фосфорного обмена в разных отделах мозга и при разных функциональных состояниях, вызванных кислородным голоданием мозга. Биохимия нервной системы*, Киев, Изд. АНУССР, 1954.
14. Крепс Е. М., Манукян К. Г., Смирнов А. А., Чирковская Е. В., *Фосфолипиды мозга в онтогенезе позвоночных.* В *Тезисы докладов конференции по вопросам гипоксии и биохимии нервной и мышечной систем*, 24., Л., (1962).
15. Marinetti G. V., Stotz E., *Paper chromatographic separation of phospholipids.* J. Amer. chem. Soc., **77**, 6688 (1955).
16. Палладни А. В., *Итоги и задачи исследований в области биохимии головного мозга.* В *Биохимия нервной системы*, Киев, Изд. АН УССР, 1954.
17. Палладин А. В., *Биохимические процессы в головном мозгу при различных функционных состояниях.* Журн. высш. нервн. деятельность, *6*, 8 (1954).
18. Paysant-Diament M., Polonovski J., *Incorporation in vitro du ^{32}P dans les phospholipides globulaires du sang humain.* Bull. Soc. chim. biol., **42**, 337 (1960)
19. Прохорова М. И., Туникова З. Н., *Скорость обновления углеводов и липидов в головном мозгу и печени при возбуждении и наркотическом сне.* В *Вопросы биохимии нервной системы*, Изд. АН УССР, Киев, 1957.
20. Прохорва М. И., Матвеева И. М., Путилина Ф. Е., Соколова Г. Е., *Скорость обновления некоторых пластических и энергетических веществ в головном мозгу.* В *Нервная система*, Изд. ЛГУ, *2*, 22 (1961).
21. Rhodes D. N., Dawson R. M. C., *Phospholipids in Chromatographic and Electrophoretic.* Ed. by I. Smith, London, N. Y., 1960, **1**, 363.
22. Rowe C. E., *The biosynthesis of phospholipids by human bload cells.* Biochem. J., **73**, 438 (1959).
23. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г., *Изучение фосфолипидов разных отделов головного мозга крысы с применением метода хроматографии на бумаге*, Биохимия, **26**, *6*, 1022 (1961).
24. Соколова Г. П., *Обмен уксусной кислоты в организме и ее участие в синтезе липидов мозга.* Вестник ЛГУ, *21*, *4*, 128 (1959).
25. Таранова Н. П., *Интенсивность обмена цереброзидов и ганглиозидов мозга.* Вестник ЛГУ № 2, Вып. 2, 114 (1961).
26. Владимиров Г. Е., Иванова Т. Н., Рубель Л. Н., *Скорость обновления фосфора в фосфолипидах мозга крыс в состоянии покоя и при возбуждении центральной нервной системы.* Труды Ин-та физиологии им. И. П. Павлова, Л., **5**, 409 (1956).
27. Ybema H. I., Leiynse B., *On the turnover rates and turnover tinces of some phospholipids in the gray and white mather of brain tissue of the rat.* Konninkl. Ned Acad. Wetenschap. Proc., ser. C., **63**, 652 (1960).

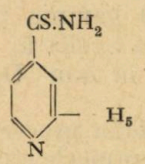
CORELAȚII ÎNTRE STRUCTURA CHIMICĂ, POTENȚIALUL OXIDOREDUCĂTOR ȘI ACTIVITATEA TUBERCULOSTATICĂ A UNOR CHIMIOTERAPICE

(ETIONIAMIDA, HIDRAZIDA I.N., TIOSEMICARBAZONA, ACIDUL ASCORBIC)

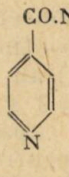
DE

EUG. PĂUNESCU

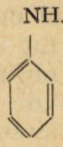
Printre cele mai noi substanțe chimioterapice cu acțiune bacteriostatică remarcabilă, atît *in vivo* cît și *in vitro*, contra bacilului tuberculozei — este și tioamida acidului α-etilizonicotinic (*sin.* : etioniamida, amidazina-CIF, 1314-Th, trécator-spécia). Produs de sinteză descoperit de cercetătorii francezi [1], etioniamida este un compus izonicotinic, cu structură înrudită cu aceea a hidrazidei acidului izonicotinic (HIN), substanță cu activitate tuberculostatică deosebită. Prin gruparea sa terminală tiocarbaminică ($-CS.NH_2$), etioniamida se apropie însă și de tiosemicarbazone, substanțe de asemenea cu acțiune importantă tuberculostatică.



Tioamida acidului α-etilizonicotinic (1314-Th)



Hidrazida acidului izonicotinic (HIN)



Tiosemicarbazona *p*-acetilaminobenzaldehidei (Tb_1)

Dacă în ceea ce privește structura chimică, etioniamida deține o poziție intermediară între HIN și Tb_1, activitatea sa antituberculoasă este ceva mai diferențiată. Astfel, este cunoscut faptul că structurile similare ale chimioterapicelor induc rezistență microbiană încrucișată; în cazul acestor trei chimioterapice, însă, pe cînd bacilii deveniți rezistenți

la Tb_1 prezintă o creştere a rezistenţei şi faţă de etioniamidă, bacilii HIN-rezistenţi nu numai că nu sînt mai rezistenţi faţă de etioniamidă, dar manifestă chiar o mai mare sensibilitate [2]. Pe de altă parte, în timp ce Tb_1 nu prezintă nici o activitate evidentă asupra metabolismului lipidic bacilar, atît HIN cît şi etioniamida — în contact cu bacilul tuberculozei — inhibă sinteza lipidelor din membrana celulară, provocînd pierderea alcooloacidorezistenţei acesteia [3].

Aceste date sugerează că — în ciuda asemănărilor structurale dintre cele trei tuberculostatice — mecanismul lor de acţiune este diferenţiat: fie în ceea ce priveşte punctul metabolic de blocaj (cazul Tb_1 şi al etioniamidei), fie în ceea ce priveşte dezvoltarea rezistenţei încrucişate (cazul HIN şi al etioniamidei).

Pentru a permite o mai bună identificare a acestor diferenţieri, am considerat util să adîncim studiul comparativ al potenţialului oxido-reducător al acestor tuberculostatice, deoarece, studii anterioare [4], [5], [6], efectuate numai pentru hidrazida izonicotinică, ne-au arătat că acest chimioterapic acţionează complex asupra proceselor de oxidoreducere : HIN poate inhiba atît procesele globale de oxidoreducere celulară [4], cît şi utilizarea oxibiotică a componentelor ciclului acizilor tricarboxilici [5]; de asemenea, HIN asigură ea însăşi un efect reducător direct [6].

În acest scop, am cercetat comparativ — la cele trei tuberculostatice luate în studiu (etioniamida, HIN şi Tb_1), precum şi la acidul ascorbic (substanţă puternic reducătoare şi dotată cu activitate tuberculicidă) [7] — în primul rînd capacitatea de a inhiba, *in vitro*, utilizarea oxibiotică a unor metaboliţi de către celula bacilară şi în al doilea rînd potenţialul reducător direct al fiecăreia dintre substanţe.

Acţiunea asupra proceselor celulare de oxidoreducere a fost studiată cu ajutorul metodei manometrice, folosind aparatul Warburg (volum constant şi presiune variabilă). Tehnica de lucru a fost cea menţionată într-o lucrare anterioară [8].

Experienţele au fost întreprinse cu *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*, tulpina H37Rv, cultură de 9 zile pe cartof glicerinat.

S-a studiat acţiunea fiecăreia din cele 4 substanţe supuse cercetării, în mod comparativ, faţă de o aceeaşi suspensie de *M. tuberculosis*, în prezenţă de diferiţi metaboliţi (conc. finală : 0,04 M). Tuberculostaticele au fost incluse la sistemul de reacţie în concentraţie de 1000 gamma pentru echivalentul a 10 mg microb uscat conţinuţi de suspensia bacilară.

Rezultatele obţinute (tabela 1) au fost exprimate în mm^3 O_2 consumaţi în 60 min de echivalentul a 1 g microb uscat.

După cum reiese din tabela 1, capacitatea de a inhiba procesele de oxidoreducere celulară este evidentă pentru toate chimioterapicele studiate, atît în cazul suspensiei-martor (*resting cell*), cît şi în cazul catabolizării anumitor metaboliţi de către aceasta. Însă, în timp ce acidul ascorbic (în concentraţia folosită) blochează aproape integral consumul de oxigen de către celula bacteriană, celelalte substanţe au o acţiune inhibitorie propriu-zisă. Această acţiune inhibitorie este mai accentuată în cazul HIN şi net mai slabă în prezenţă de Tb_1, etioniamida exercitînd o acţiune asemănătoare cu a HIN, în special în cazul suspensiei-martor şi a glicerinei, succinatului şi citidinei.

În ceea ce privește, deci, acțiunea asupra proceselor celulare de oxidoreducere, acidul ascorbic se diferențiază net (acțiune de blocaj) de tuberculostaticele propriu-zise, care exercită numai un efect inhibitor.

Tabela 1

Acțiunea unor chimioterapice asupra proceselor celulare de oxidoreducere

Sistemul	Consumul de oxigen				
	În absență de antibiotice	În prezență de HIN	În prezență de etioniamidă	În prezență de Tb_1	În prezență de acid ascorbic
Suspensie (*resting cell*)	4 870	4 085	4 145	4 175	1 020*)
Suspensie + glicerină	7 770	4 655	4 775	6 025	1 060
Suspensie + acetat	6 720	4 335	4 740	5 940	935
Suspensie + succinat	5 775	4 660	4 315	4 895	1 025
Suspensie + citidină	6 510	4 345	4 250	5 670	1 105
Suspensie + glicocol	7 650	5 780	5 510	5 355	970
Suspensie + glicerină + citrat	6 805	4 815	5 980	4 910	1 095

*) După primele 10–15 min de contact cu acidul ascorbic, celula bacteriană nu mai consumă oxigen.

Potențialul de oxidoreducere al chimioterapicelor studiate a fost apreciat cu ajutorul clorurii de trifenil-tetrazoliu (CTT), care — în prezența unor agenți reducători — este supusă unui proces de hidrogenare, dînd naștere la formazani (colorați în roșu). Tehnica de lucru a fost cea descrisă anterior [6], [8], sistemul de reacție fiind format, după caz, din :

Sistemul A

— 1 ml soluție apoasă 0,1 M, pH 7, dintr-un metabolit (donator de hidrogen);
— 0,5 ml soluție tampon fosfați 0,4 M (pH între 5 și 12);
— 0,5 ml dintr-o soluție apoasă conținînd într-un ml 2 000 gamma din substanța chimioterapică studiată;
— 0,5 ml dintr-o soluție apoasă 0,2% CTT.

Sistemul B

este identic cu sistemul *A*, cu singura deosebire că, în loc de soluția de metaboliți, conține 1 ml apă distilată.

În unele cazuri, la ambele sisteme s-au adăugat cîte 0,25 ml dintr-o soluție apoasă de versen (EDTA), cu concentrații variate, pentru a determina titrul agentului chelator care poate împiedica acțiunea reducătoare directă a chimioterapicului.

Ca metaboliți donatori de hidrogen am cercetat: metolul, baze organice azotate purinice (guanină, adenină) și pirimidinice (timină, uracil), nucleozide pirimidinice (citidină), acizi organici (acetic, lactic, succinic, formic), aminoacizi (glutamic, aspartic, alanină), cetoacizi (piruvic, glutaric, oxalacetic), unele săruri anorganice (cloruri, sulfați).

După 30 min de contact la 37°C (baie cu apă), sistemul a fost răcit brusc și formazanul format a fost extras cu dioxan și colorimetrat (filtrul albastru) la fotometrul tip Pulfrich.

Rezultatele obținute sînt prezentate în tabela 2.

Din datele prezentate în tabelă rezultă, în primul rînd, că putere reducătoare manifestă numai HIN, etioniamida și acidul ascorbic și numai în condiții de alcalinitate; Tb_1 este lipsită de acțiune reducătoare directă.

Tabela 2

Potențialul de oxidoreducere al unor chimioterapice

Amestecul supus	Intensitatea formării de formazan				
	În absență de chimioterapice	În prezență de 1 000 gamma de			
		HIN	Etioniamidă	Tb_1	Acid ascorbic
Sistemul A — pH 5—7	—	—	—	—	—
Sistemul A — pH 8—9	—	++	+	—	+
Sistemul A — pH 10—12	—	++	++	—	+++
Sistemul B — pH 5—7	—	—	—	—	—
Sistemul B — pH 8—9	—	++	—	—	+
Sistemul B — pH 10—12	—	++	—	—	+++
Sistemul A (pH 10) + EDTA	—	125 gamma*)	30 gamma*)	—	10 000 gamma *)

*) Valorile reprezintă cantitățile minime de EDTA care pot inhiba reducerea CTT în formazan.

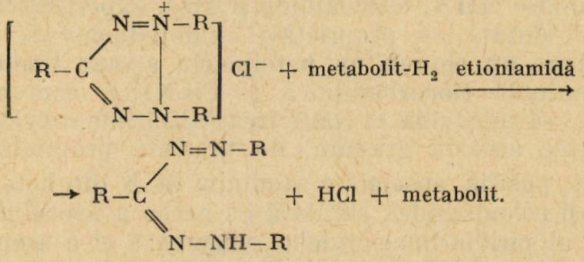
Un alt fapt demn de reliefat este comportarea diferențiată a celor trei chimioterapice dotate cu capacitate reducătoare: în timp ce HIN și acidul ascorbic pot hidrogena CTT atît în prezența, cît și în absența unuia dintre metaboliții investigați, etioniamida nu provoacă transformarea CTT → formazan decît în prezența unui metabolit. Cu alte cuvinte, acidul ascorbic și HIN pot reacționa direct cu CTT, cedînd hidrogenul necesar reducerii CTT în formazan:

Acid ascorbic + CTT → acid dehidroascorbic + formazan

HIN + CTT → HIN-dehidrogenată + formazan.

Aceasta spre deosebire de etioniamidă care, pentru a reduce CTT, are nevoie de prezența unui metabolit, care să joace rolul de donator de

hidrogen. În reacția care are loc, etioniamida joacă rol de transportor de hidrogen, astfel că reacția poate fi imaginată ca similară cu reacțiile catalizate de enzimele piridin-nucleotidice



De altfel, nu orice metabolit poate îndeplini rolul de donator de hidrogen în reacția de tipul celei descrise ; această calitate pare să depindă de capacitatea substanței de a mobiliza ioni H, în anumite condiții de mediu. Astfel, la pH 9, etioniamida poate mijloci transformarea CTT→ formazan într-un timp scurt (5 min la 37°C) în prezența metolului, bazelor organice azotate și nucleotidelor ; în aceleași condiții, aminoacizii și acizii organici permit realizarea transformării într-o perioadă de timp mai îndelungată (10—30 min), iar cetoacizii și sărurile anorganice nu pot contribui la declanșarea reacției nici după 24 de ore de contact la 37°C. Dacă însă sistemul se realizează într-un mediu puternic alcalin (pH 12), cetoacizii și chiar sulfatul de amoniu (dintre sărurile anorganice) au condiții de mobilizare a ionilor H, asigurînd transformarea CTT → formazan în prezența etioniamidei.

În sfîrșit, în ceea ce privește puterea agenților chelatori (EDTA) de a inhiba capacitatea oxidoreducătoare a substanțelor cercetate, așa cum este arătat în tabela 2, cantitățile minime eficace variază în funcție de chimioterapic : în timp ce numai 30 gamma EDTA pot neutraliza acțiunea reducătoare indirectă a 1 000 gamma etioniamidă și 125 gamma EDTA pot inhiba acțiunea reducătoare directă a aceleiași cantități de HIN, — activitatea reducătoare a 1 000 gamma acid ascorbic este inhibată abia de cantități de peste 10 000 gamma EDTA. Aceste date arată că puterea reducătoare (indirectă) a etioniamidei este mai slabă decît a HIN și foarte mică în comparație cu aceea a acidului ascorbic.

DISCUȚII ȘI CONCLUZII

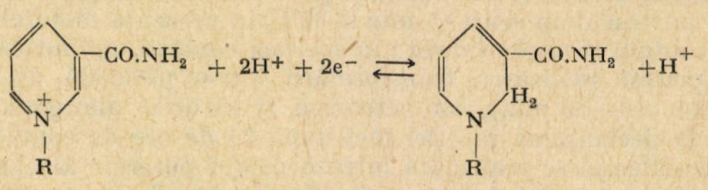
Agenții de oxidoreducere manifestă un potențial tuberculostatic net, care *in vitro* este proporțional cu puterea reducătoare a substanței. Acest efect tuberculostatic este rezultatul dezechilibrului celular al sistemelor de oxidoreducere enzimatică, pe care îl provoacă substanța chimioterapică [7].

Rezultatele experiențelor noastre confirmă acest punct de vedere : substanțele reducătoare (acidul ascorbic, HIN și etioniamida) au proprietatea de a inhiba procesele celulare enzimatice de oxidoreducere, cu o intensitate care, *in vitro*, este proporțională cu puterea reducătoare a substanței. *In vivo*, însă, corelația directă dintre activitatea reducătoare și efectul tuberculostatic nu se menține, deoarece HIN și etioniamida

au o putere tuberculostatică mult mai mare decît aceea a acidului ascorbic (care posedă, în schimb, cea mai intensă activitate reducătoare).

În ceea ce privește structura chimică, în cazul celor trei tuberculostatice propriu-zise (HIN, etioniamida și Tb_1), experiențele întreprinse au arătat că sînt dotate cu proprietăți oxidoreducătoare numai HIN și etioniamida, care au comun un heterociclu azotat (inelul izonicotinic). Gruparea terminală tiocarbaminică ($-CS.NH_2$), comună etioniamidei și Tb_1, nu pare să intervină la conferirea calităților reducătoare, deoarece Tb_1 (care deține această grupare) nu prezintă proprietăți reducătoare.

În sfîrșit, poziția specială a atomului de N din heterociclul izonicotinic al HIN și etioniamidei, similară cu aceea a azotului în heterociclul nicotinamidic al piridin-nucleotidelor, sugerează și o asemănare a mecanismului de reducere (directă sau indirectă, de donatori sau transportori de hidrogen) al acestor substanțe. În cazul coenzimelor piridin-nucleotidice, atomul de azot din inelul izonicotinic realizează acceptarea reversibilă, pe heterociclul piridinic, a doi electroni și a unui proton



Pentru hidrazida izonicotinică și pentru tioamida acidului α-etilizonicotinic, această schemă este deosebit de sugestivă și, în cercetări ulterioare, urmează să controlăm în ce măsură poate fi extinsă și pentru ilustrarea proceselor de reducere mijlocite de aceste tuberculostatice. Totodată, însă, va trebui să se țină seama și de deosebirea existentă între mecanismul de reacție al celor două chimioterapice, deoarece în timp ce HIN reduce direct CTT, etioniamida realizează reducerea CTT la formazan în mod indirect, mijlocind transferul de hidrogen de la un substrat la acceptor (CTT).

Prezentată la redacție
la 20 iulie 1962

*Laboratorul de biochimie și fiziologie bacteriană
al Institutului de ftiziologie, București*

СООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ ХИМИЧЕСКИМ СТРОЕНИЕМ, ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ И ТУБЕРКУЛОСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ НЕКОТОРЫХ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ (ЭТИОНИАМИД, ГИК, ТИОСЕМИКАРБАЗОН, АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА)

РЕЗЮМЕ

Гидразид изоникотиновой кислоты (ГИК) может быть восстановлен до формазана хлористого трифенилтетразомия (ХТТ) прямым путем, в щелочной среде, подобно аскорбиновой кислоте. В то время,

когда 125 γ ЭДТА нейтрализуют восстанавливающее действие 1 000 γ ГИК для того же количества аскорбиновой кислоты необходимо 10 000 хелатного вещества.

Этиониамид также восстанавливает ХТТ, но лишь в присутствии некоторых метаболитов (азотистых органических оснований, аминокислот, метола, органических кислот), способствующих переносу водорода на ХТТ. 30 γ ЭДТА может блокировать восстанавливающее действие 100 этиониамида.

Тиосемикарбазид, обладающий подобно этиониамиду концевой группой — $CSNH_2$ и тормозящий энзиматические окислительно-восстановительные клеточные процессы (Myob. tuberculosis) не оказывает восстанавливающего действия на ХТТ.

Специальное положение азотного атома в изоникотиновом гетероцикле, общем для обоих туберкулостатических веществ, восстанавливающих ХТТ (ГИК и этиониамид), говорит о том, что механизм восстановления сходен с механизмом, обусловленным наличием азотного атома в никотинамидном гетероцикле пиридин-нуклеотидных коэнзимов.

CORRÉLATIONS ENTRE LA STRUCTURE CHIMIQUE, LE POTENTIEL OXYDO-RÉDUCTEUR ET L'ACTIVITÉ TUBERCULOSTATIQUE DE QUELQUES SUBSTANCES CHIMIOTHÉRAPEUTIQUES (ÉTHIONAMIDE, HYDRAZIDE I. N., THIOSEMICARBAZONE, ACIDE ASCORBIQUE)

RÉSUMÉ

L'hydrazide de l'acide isonicotinique (INH) peut directement réaliser la réduction en formazane du chlorure de triphényltétrazol (TTC) en milieu alcalin de la même façon que l'acide ascorbique ; mais, tandis que 125 gamma EDTA neutralisent l'action réductrice de 1 000 gamma INH, pour la même quantité d'acide ascorbique et pour obtenir le même effet sont nécessaires plus de 10 000 gamma d'agent chélatisant.

L'éthionamide peut elle aussi réduire le TTC, mais seulement en présence de certains métabolites (bases organiques azotées, aminoacides, méthol, acides organiques), en favorisant le transfert d'hydrogène de ceux-ci sur le TTC. Une quantité de 30 gamma d'agent chélatisant (EDTA) peut bloquer l'activité réductrice de 1 000 gamma d'éthionamide.

La thiosemicarbazone qui possède le groupement terminal — $CSNH_2$ tout comme l'éthionamide et qui inhibe les processus enzymatiques d'oxydoréduction cellulaire (*Mycob. tuberculosis*), ne manifeste pas pourtant d'action réductrice sur le TTC.

La position particulière de l'atome N du hétérocycle isonicotinique qui est commun aux deux tuberculostatiques à action réductrice sur le

TTC (INH et éthionamide) suggère comme mécanisme de la réduction un processus similaire à celui réalisé par l'atome d'azote du hétérocycle nicotinamidique des coenzymes pyridine-nucléotidiques.

BIBLIOGRAFIE

1. N. RIST, Progr. Explor. Tuberc. (Basel), **X**, 69 (1960).
2. EUG. PĂUNESCU, G. ALGEORGE, Ftiziologia, **XI**, *3*, 245 (1962).
3. F. GRUMBACH, N. RIST, D. LIBERMANN, C. R. Acad. Sci. (Paris), **242**, 2187 (1956).
4. M. NASTA, EUG. PĂUNESCO, P. GEORGESCO, Ann. Inst. Pasteur (Paris), **99**, 504 (1960).
5. M. NASTA, EUG. PĂUNESCU, Studii şi cercet. de inframicrobiol., microbiol. şi parazitol., **IX**, *4*, 471 (1958).
6. EUG. PĂUNESCU, Studii şi cercet. de biochimie, **IV**, *4*, 543 (1961).
7. J. SVACHULOVA, Rozhl. Tuberk., **16**, 203 (1956).
8. P. GEORGESCU, EUG. PĂUNESCU, *Metode biochimice de diagnostic şi cercetare*, Ed. medicală, Bucureşti, 1960.

MICROMETODĂ PENTRU DOZAREA COLESTEROLULUI TOTAL, ESTERIFICAT ŞI LIBER

DE

P. GEORGESCU şi ELENA CONSTANTINESCU

Dozarea colesterolului total şi a fracţiunilor sale, liberă şi esterificată, reprezintă un mijloc folosit foarte frecvent în laboratorul clinic pentru explorarea metabolismului lipidic [1], [2]. Marele număr de metode propuse pentru dozarea colesterolului arată pe de o parte importanţa acestei probleme, iar pe de altă parte reflectă faptul că multe dintre metodele propuse nu au dat satisfacţie, unele fiind prea laborioase, în timp ce altele sînt lipsite de sensibilitate şi precizie sau se pretează la o serie de erori.

Am cercetat comparativ aceste metode, cu scopul de a pune la punct o micrometodă simplă şi sensibilă pentru dozarea în acelaşi extract lipidic a colesterolului total şi a fracţiunilor sale, esterificată şi liberă, fără precipitarea prealabilă a fracţiunii libere cu digitonină.

În principiu, tehnicile de dozare a colesterolului se bazează pe extracţia acestuia cu solvenţi organici : eter [3], amestec alcool-eter [4], amestec alcool-acetonă-tricloretilenă [5], amestec alcool-acetat de etil [6].

În extractul lipidic se dozează separat colesterolul total şi cel esterificat, după precipitarea fracţiunii libere cu digitonină, valoarea ultimului component fiind calculată prin diferenţă.

Reziduul obţinut prin evaporarea extractului lipidic se dizolvă în cloroform sau amestec de cloroform-acid acetic şi se efectuează reacţia de culoare a colesterolului cu anumiţi reactivi specifici. Metodele folosite în acest scop sînt date în literatură [7], [8], [9].

Reacţia Salkowski, bazată iniţial numai pe acidul sulfuric, a devenit mai sensibilă prin adăugarea unor catalizatori, cum sînt clorura ferică [10] sau oxidul roşu de mercur [11].

Reacţia Liebermann are loc în prezenţa anhidridei acetice şi a unei cantităţi mici de acid sulfuric concentrat. Modificările aduse acestei metode s-au făcut cu scopul de a elimina extracţia prealabilă a colesterolului, reacţia de culoare urmînd a se efectua direct pe ser. Pentru aceasta s-a

preconizat folosirea acidului *p*-toluensulfonic, alături de anhidridă acetică și acid sulfuric [12]. Acidul *p*-toluensulfonic prezintă pericol de explozie, astfel că s-a propus înlocuirea lui cu acid sulfosalicilic [13].

Reacția Tschugaeff, bazată pe acțiunea la cald a clorurii de zinc asupra colesterolului, a devenit mai sensibilă prin adăugarea clorurii de acetil [14].

Pe lîngă aceste metode colorimetrice, s-a propus recent o metodă turbidimetrică [15], [16].

Metodele colorimetrice mai frecvent folosite în laboratorul clinic sînt : metoda Grigaut, bazată pe reacția Liebermann-Bourchard, și metoda Zlatkis și colaboratorii, bazată pe reacția Salkowski.

Metoda Grigaut prezintă însă o serie de dezavantaje, și anume :

1. Cinetica reacției Liebermann nu este superpozabilă pentru colesterolul liber și colesterolul esterificat. În plus, dezvoltarea unei succesiuni de culori : roz, violet, albastru, verde, galben, brun impune ca lectura colorimetrică sau fotometrică să se facă pentru culoarea verde la un anumit interval de timp (variabil, după diferiți autori, între 15 și 30 min) de la adăugarea ultimului reactiv, cînd se presupune că intensitatea acestei culori este maximă [17], [18], [19].

2. Culoarea nu este stabilă.

3. O serie de factori cum sînt temperatura, lumina, proporția și puritatea reactivilor pot modifica considerabil cinetica reacției.

4. Frecvent se constată la sfîrșitul dozării diferențe de nuanță a culorilor celor două soluții de comparat. Aceste diferențe se datoresc faptului că, în afară de colesterol, reacția Liebermann este dată și de alți steroli (7-dihidrocolesterol, dihidroepiandrosteronă etc.) care se găsesc în sînge. Trebuie deci să se compare o colorație Liebermann provenită din colesterol pur (soluția-etalon) cu aceea provenită dintr-un amestec de colesterol liber, esteri ai colesterolului și alți steroli (soluția de analizat) [20].

Metoda Zlatkis elimină cea mai mare parte dintre erorile și dificultățile metodei clasice Grigaut, și anume :

1. În condiții identice de temperatură, cinetica reacției este aceeași atît pentru colesterolul liber cît și pentru esterii săi.

2. Reacția cu clorură ferică este mult mai sensibilă. În aceleași condiții de lucru se obține o densitate optică de 10 ori mai mare decît în reacția Liebermann.

3. Colorația atinge maximum în 30 min și este stabilă cîteva ore.

Deși metoda Zlatkis asigură o precizie și o sensibilitate suficientă, prezintă și ea dezavantajul că pentru dozarea colesterolului esterificat este necesară precipitarea prealabilă a colesterolului liber cu digitonină.

Pentru a înlătura și acest neajuns am pornit de la cercetările recente [21] asupra reacțiilor de culoare ale colesterolului cu diferiți reactivi și asupra cineticii reacției cu clorură ferică în funcție de temperatură [22], și am pus la punct o micrometodă pentru dozarea colesterolului total, esterificat și liber, fără precipitarea fracțiunii libere cu digitonină.

DESCRIEREA METODEI

Principiu : clorura ferică, în soluție acetică și în prezența acidului sulfuric, reacționează cu colesterolul dezvoltînd o coloratie roșie-purpurie. Natura exactă a reacției este necunoscută. Are loc, probabil, o deshidratare, cu oxidarea colesterolului. Cantitatea de fier feros rezultată din reacție și determinată colorimetric este proporțională cu cantitatea de colesterol.

Cinetica acestei reacții este în funcție de temperatură, și anume : la temperatura de 65°C clorura ferică reacționează atît cu colesterolul liber cît și cu esterii săi, în timp ce la 20°C ea reacționează, în primele 2 ore, numai cu colesterolul liber. După acest interval de timp intră în reacție și colesterolul esterificat. În condiții diferite de temperatură devine deci posibilă dozarea în același extract lipidic atît a colesterolului total cît și a colesterolului liber, calculul colesterolului esterificat făcîndu-se apoi prin diferență.

Reactivi :

a) amestec alcool 96°-acetonă 1 : 2 în volume, *b*) eter rectificat *c*) cloroform pur, *d*) acid acetic p.a. (lipsit de substanțe oxidante), *e*) soluție de clorură ferică pură 1% în acid acetic p.a., *f*) acid sulfuric conc. p.a. D=1,84 (lipsit de substanțe oxidante), *g*) amestec acid acetic-acid sulfuric 1 : 1 în volume (se adaugă cu precauție acid sulfuric în acid acetic, se lasă să se răcească înainte de întrebuințare), *h*) soluție etalon de colesterol : se dizolvă 50 mg colesterol în 100 ml acid acetic p.a.

Tehnica. Într-un Erlenmeyer de 50 ml se introduc 12 ml amestec alcool-acetonă (*a*) și 0,3 ml ser. După agitare se adaugă 6 ml eter (*b*) și se agită din nou. Se filtrează prin filtru cantitativ într-o capsulă de porțelan sau de sticlă, acoperind pîlnia cu o sticlă de ceas. Se spală Erlenmeyerul și filtrul de 2 ori cu cîte 3 ml eter, care se culeg tot în capsulă. Se evaporă la sec, la 55—60°C, într-o etuvă electrică sau pe baia de apă. După răcire se dizolvă reziduul în 0,5 ml cloroform *(c)*, apoi se adaugă imediat 1,9 ml acid acetic (*d*). Se amestecă bine, se iau două eprubete cu diametrul de 20 mm, notate respectiv cu T și L, și se repartizează repede : 0,4 ml amestec acetocloroformic (0,05 ml ser) în eprubeta T și 0,8 ml extract lipidic în eprubeta L (0,10 ml ser).

În eprubeta T (colesterol total) se pun 2,4 ml acid acetic (*d*) și 0,2 ml soluție clorură ferică (*e*). Se agită bine, apoi se adaugă încet, astfel ca să se prelingă pe pereții eprubetei 2 ml acid sulfuric *(f)*. Se așteaptă 2—3 min pentru ca acidul sulfuric să ajungă la fundul eprubetei, apoi se agită foarte bine, pînă cînd soluția siropoasă devine perfect omogenă. Amestecul celor doi acizi (acetic și sulfuric) provoacă, în aceste condiții, o ridicare a temperaturii pînă la 65°C. Se lasă o oră în repaus pentru dezvoltarea culorii.

În eprubeta L (colesterol liber) se adaugă 0,2 ml soluție clorură ferică (*e*) și 4 ml amestec de acid acetic-acid sulfuric (*g*), răcit la temperatura laboratorului, apoi se agită ca mai sus și se introduce eprubeta într-o baie de apă la 20°C, unde se lasă o oră pentru dezvoltarea culorii.

Pentru lectura colorimetrică se pregătesc, paralel cu aceste operaţii şi în aceleaşi condiţii, două etaloane, şi anume :

Pentru colesterolul total : 0,2 ml soluţie etalon (*h*), 2,6 ml acid acetic (*d*), 0,2 ml soluţie de clorură ferică (*e*) şi 2 ml acid sulfuric (*f*). Pentru colesterolul liber : 0,2 ml soluţie etalon (*h*), 0,6 ml acid acetic (*d*), 0,2 ml soluţie de clorură ferică (*e*) şi 4 ml amestec de acid acetic-acid sulfuric (*g*).

Calcul:

$$\text{Colesterol total (mg\%)} = \frac{\text{Înălţimea sol. etalon}}{\text{Înălţimea sol. de cercetat}} \times 200,$$

$$\text{Colesterol liber (mg\%)} = \frac{\text{Înălţimea sol. etalon}}{\text{Înălţimea sol. de cercetat}} \times 100.$$

Pentru lectura fotometrică se stabilesc două curbe de etalonare după următoarea schemă :

Colesterol total

ml soluţie etalon	0	0,1	0,2	0,3	0,4
ml acid acetic	2,8	2,7	2,6	2,5	2,4

În fiecare eprubetă se adaugă cîte 0,2 ml soluţie acetică de clorură ferică şi 2 ml acid sulfuric.

Cantităţile de soluţie etalon luate în lucru corespund respectiv la 100 ; 200 ; 300 şi 400 mg% colesterol total.

Colesterol liber

ml soluţie etalon	0	0,1	0,2	0,3	0,4
ml acid acetic	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4

În fiecare eprubetă se adaugă cîte 0,2 ml soluţie acetică de clorură ferică şi 4 ml amestec de acid acetic - acid sulfuric. Cantităţile de soluţie etalon luate în lucru corespund respectiv la 50 ; 100 ; 150 şi 200 mg% colesterol liber.

Lectura fotometrică se face cu cuva de 1 ml, filtru galben de 570 mμ, folosind drept lichid compensator martorul alb.

OBSERVAŢII

Micrometoda a fost verificată, comparativ, atît pe seruri normale cît şi pe seruri obţinute de la pacienţi cu diferite afecţiuni susceptibile să producă alterări ale metabolismului lipidic [23].

Rezultatele obţinute sînt foarte exacte dacă se respectă următoarele precauţii :

1. Folosirea de acid acetic şi acid sulfuric p.a., lipsiţi de substanţe oxidante, care pot oxida secundar cromoforul purpuriu, provocînd o scădere corespunzătoare a densităţii optice.

Acidul acetic se purifică prin redistilare şi eliminarea produselor de la începutul şi sfîrşitul distilării.

2. Omogenizarea cît mai perfectă a amestecului final pentru ca cinetica reacției de culoare să aibă loc în condiții standard.
3. Menținerea temperaturii de 20°C la dozarea colesterolului liber.
4. Lectura colorimetrică la 60 min.
5. Valorile normale ale metodei sînt de 190—240 mg%.

CONCLUZII

Micrometoda propusă este mai simplă, mai sensibilă și mai rapidă decît metodele clasice descrise pentru dozarea colesterolului total, esterificat și liber. Folosind reactivi ieftini și uzuali, ea se poate aplica în orice laborator care posedă un colorimetru sau fotocolorimetru.

Prezentată la redacție
la 20 iulie 1962

Laboratorul de biochimie
al Institutului clinic de ftiziologie,
București

МИКРОМЕТОД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО, ЭТЕРИФИЦИРОВАННОГО И СВОБОДНОГО ХОЛЕСТЕРОЛА

РЕЗЮМЕ

Авторы предлагают микрометод для определения общего, этерифицированного и свободного холестерола, без осаждения свободной фракции дигитонином.

Микрометод основан на различной кинетике, в зависимости от температуры, реакции с хлористым железом, а именно: при 65°C хлористое железо реагирует как со свободным холестеролом, так и с его эфирами, тогда как при 20°C оно реагирует в течение первых двух часов только со свободным холестеролом.

Микрометод более прост, чувствителен и скор, чем классические методы определения общего, свободного и этерифицированного холэстерола.

Ввиду того, что он требует дешевых и обычных реактивов, метод легко применим в какой угодно лаборатории, где есть колориметр или фотоколориметр.

MICROMÉTHODE POUR LE DOSAGE DU CHOLESTÉROL TOTAL, ESTÉRIFIÉ ET LIBRE

RÉSUMÉ

On a mis au point une microméthode permettant le dosage du cholestérol total, estérifié et libre, sans précipitation de la fraction libre à l'aide de la digitonine.

Cette microméthode est fondée sur la cinétique différente, suivant la température, de la réaction au chlorure ferrique à savoir : à la température de 65°C le chlorure ferrique réagit tant avec le cholestérol libre qu'avec ses esters, tandis qu'à 20°C il réagit pendant les 2 premières heures seulement avec le cholestérol libre.

La méthode est plus simple, plus sensible et plus rapide que les méthodes classiques pour le dosage du cholestérol total, estérifié et libre. Puisqu'elle ne met en œuvre que des réactifs non coûteux et usuels, elle peut être utilisée dans tout laboratoire possédant un colorimètre ou un photocolorimètre.

BIBLIOGRAFIE

1. В. С. Смоленски, *Атеросклероз*, Медгиз, Москва, 1953.
2. V. Beroniade, A. Condacse, E. Rădulescu, *Lipidele*, Ed. medicală, Bucureşti, 1960.
3. A. Grigaut, C. R. Soc. Biol., **68**, 791 (1910).
4. W. R. Bloor, A. Kundson, J. Biol. Chem., **24**, 227 (1916).
5. M. Paget, G. Pierrart, Bull. Soc. Chim. Biol., **2**, 537 (1939).
6. H. Jérome, P. Fonty, H. Vernin, F. Leplaideur, Ann. Biol. Clin., *1—2*, 117 (1962).
7. E. Salkowski, Z. Anal. Chem.,*11*, 443 (1872).
8. C. Liebermann, Ber. dtsch. chem. Ges., **18**, 1803 (1886).
9. L. A. Tschugaeff, Chem. Z., **24**, 542 (1900).
10. A. Zlatkis, B. Zak, A. Boyle, J. Lab. and Clin. Med., **41**, 485 (1953).
11. M. Pesez, Bull. Soc. Chim. Fr., **25**, 369 (1958).
12. S. Pearson, S. Stern, T. H. Mac Gavack, Anal. Chem., **25**, 813 (1953).
13. F. Rappaport, P. Eichorn, Clin. Chem. Acta , *5*, 161 (1960).
14. A. L. Bernouilli, Helv. Chim. Acta, **15**, 274 (1932).
15. М. Ледвина, Лав. дело, *3*, 13 (1960).
16. Х. Кринитки, Лаб. Дело, *4*, 27 (1961).
17. E. V. Predtecenschi, M. V. Borovskaia, L. T. Margolina, *Metode de laborator clinic*, Ed. de Stat, Bucureşti, 1953, 229.
18. V. N. Paladin, *Manual de chimie biologică*, Ed. de Stat, Bucureşti, 1949.
19. Б. И. Збарский, И. И. Иванов, С. Р. Мардашев, *Биохимическая химия*, Медгиз, Москва, 1954.
20. P. Georgescu, E. Păunescu, *Metode biochimice de diagnostic şi cercetare*, Ed. medicală, Bucureşti, 1960.
21. B. Zak, E. Epstein, Clin. Chim. Acta, **6**, 72 (1961).
22. M. Girard, E. Assous, Bull. Soc. Chim. Biol., *9—10*, 1097 (1961).
23. P. Georgescu, I. Popescu, E. Păunescu, *Ftiziologia*, *1* 1963, (sub tipar).

I. PROBLEME GENERALE. METODE DE CERCETARE

1380. ȘTEFĂNESCU P. N., *Dozarea polarografică a corticosteroizilor din urină.* Studii și cercet. fiziol., 1962, **7**, *1*, 129—131.

Se dau condițiile de lucru pentru dozarea polarografică a corticosteroizilor din urină. Metoda cuprinde următoarele patru faze: hidroliza, extracția, cromatografia pe coloană și determinarea polarografică.

H. D. Schell

1381. NICOLAU ȘT. S., *Hepatita epidemică inframicrobiană: virusul bolii.* Studii și cercet. inframicrobiol., 1961, **XII**, *2*, 185—189.

Referat general cu 60 de indicații bibliografice.

D. Tănăsescu

1382 ILCA ST., *Micrometodă pentru dozarea colesterinei serice.* Studii și cercet. chim., Timișoara, **VIII**, *1—2*, 127—131.

Colesterina liberă și esterificată este determinată printr-o reacție Lieberman directă, fără a fi nevoie de saponificare, filtrare, centrifugare și evaporare. Compararea metodei prezentate cu metoda Grigaut a dat devieri cuprinse între +6,5% și — 3,2%, față de metoda Neuschloss a dat devieri de +6,2% și — 3,3%, iar față de metoda Zak a dat devieri de +2,2% și —10,6%.

N. Luță-Moldoveanu

1383. ILCA ST., *Metodă pentru dozarea pigmenților biliari în urină.* Studii și cercet. chim. Timișoara, 1961, **VIII**, *1—2*, 133—135.

Se precipită bilirubina sub formă de sare de bariu și se determină colorimetric concentrația bilirubinei din precipitatul solubilizat la un pH acid. Produsul final poate fi folosit și în cromatografie și electroforeză. Limita sensibilității metodei (stabilită în raport cu o soluție pură de bilirubină) este de ordinul 1/1 000 000.

N. Luță-Moldoveanu

1384. COTĂESCU I., *Contribuție la studiul contradicției interne în materia vie.* Studii și cercet. med., Timișoara, 1961, **VIII**, *3—4*, 239—266.

Studiu teoretic cu 19 indicații bibliografice.

L. Arnet

1385. DRAGOMIRESCU M., *Biofactori modificatori ai probelor de precipitare.* Studii și cercet. med., Timișoara, 1961, **VIII**, *3—4*, 309—315.

Cantități mici de bilă C (sau acizii biliari în concentrații cuprinse între 2 și 20%) sînt capabile, prin incubare la 20 și 30°C, timp de 24 de ore, să modifice floculareа timolică, în sensul diminuării, și precipitarea fenolică, în sensul creșterii, efectuate cu serurile bolnavilor de hepatită epidemică. Aceste date pun în discuție valoarea interpretativă a probelor de disproteinemie la bolnavii hepatici prezentînd o pronunțată componență de stază biliară, întrucît apare posibilă, în baza datelor prezentate, o mascare a gradului real de precipitare în urma creșterii concentrației plasmatice în produși de retenție biliară.

L. Arnet

1386. ANCUȘA M., CEAUȘESCU D. și IONESCU E., *Problema variațiilor concentrației iodului și fluorului în apele naturale.* Studii și cercet. med., Timișoara, 1961, **VIII**, *3—4*, 325—331.

Variațiile în ceea ce privește conținutul apelor naturale în fluor sînt în general relativ mici. Variațiile conținutului în iod pot atinge însă valori mari, pînă la 100%. Pentru a pune în evidență situațiile extreme, urmează a se face determinări în perioadele de precipitații minime și maxime.

L. Arnet

1387. APREOTESEI C. şi TEODOSIU M., *Consideraţii teoretice asupra metodei electroforetice de analiză.* Farmacia, 1961, **IX**, *9*, 513—523.

Referat general cu 10 indicaţii bibliografice.

D. Moţet-Grigoraş

1388. ŢIGĂERU N. şi GUSTAV M., *Aparat de liofilizare centrifugal electromagnetic.* Lucr. şt. Inst. Pasteur Buc., 1961, **V**, 325—330.

Autorii au construit un aparat centrifugal de liofilizare, acţionat electromagnetic. Aparatul este prevăzut cu dispozitiv pentru uscare secundară şi închidere sub vid. Durata uscării primare este de 4—7 ore, iar a celei secundare de 2—6 ore, după cantitatea şi felul produsului. Umiditatea reziduală a produsului liofilizat este de maximum 1%.

D. Tănăsescu

1389. FRONESCU E. şi VLĂDESCU N., *Cercetări asupra reacţiei Kunkel cu fenol în diagnosticul aterosclerozei.* Med. int., 1962, **XIV**, *2*, 221—227.

Se recomandă întrebuinţarea reactivului Kunkel normal (K_6) cu 6 g NaCl în soluţie şi a reactivului Kunkel (K_{12}) cu 12 g NaCl. Unele cazuri de ateromatoză se diferenţiază prin K_6 normal, dar cu reactivul K_{12} net mărit. Întrebuinţîndu-se proba de supraîncărcare lipidică, diferenţa se măreşte considerabil, ateromatoşii prezentînd o mărire mult mai accentuată a valorilor — în special pentru K_6 — faţă de normali.

C. Şelariu

1390. IONESCU N., GEORGESCU E., TEODORESCU F., GEORGESCU C. şi TOADER GH., *Consideraţii critice asupra testelor de disproteinemie, cu referire specială la reacţia Sellek-Frade.* Med. int., 1962, **XIV**, *3*, 359—365.

Autorii expun experienţa lor personală cu privire la reacţia Sellek-Frade (sol. acetat de cupru, citire cu ochiul liber) şi conchid că testele de disproteinemie nu sînt specifice.

C. Şelariu

1391. HADNAGY CS., *Afibrinogenemia şi hipofibrinogenemia.* Med. int., 1962, **XIV**, *4*, 143—151.

Referat general fără indicaţii bibliografice.

C. Şelariu

1392. GALEA GH., ILIE E. şi BONA C., *Consideraţii asupra unor leziuni enzimatice ale metabolismului fosfolipidic şi glicolipidic din tezaurismoze.* Med. int.; 1962, **XIV**, *4*, 393—403.

Referat general fără indicaţii bibliografice.

C. Şelariu

1393. BOTEZ V., *Metode enzimatice de control al vaccinului B.C.G.* Microbiol., parazitol., 1961, **VI**, *4*, 317—326.

Referat general cu 92 de indicaţii bibliografice.

D. Tănăsescu

1394. BALŞ M., *Noţiuni practice elementare pentru folosirea tehnicii anticorpilor fluorescenţi* Microbiol., parazitol., 1961, **VI**, *5*, 455—460.

Referat general, cu 18 indicaţii bibliografice.

D. Tănăsescu

1395. VELICAN D., *Interpretarea histochimică a metacromaziei.* Morfol. norm. pat., 1961, *3*, 211—223.

Referat general cu 33 de indicaţii bibliografice.

D. Cotariu

1396. BRACHET Y., *Rolul grupelor sulfhidrilice în diviziunea celulară şi morfogeneză.* Morfol. norm. pat., 1961, *4*, 289—302.

Referat general cu 29 de indicaţii bibliografice.

D. Cotariu

1397. HĂULICĂ I., *Date noi în transmiterea neuro-chimică centrală.* Rev. medico-chirurgic., Iaşi, 1961, **LXV**, *3*, 569—582.

Referat general cu 92 de indicaţii bibliografice.

A. Baicu

1398. MARCU C. şi MANOLESCU E., *Substanţe cu acţiune hipocolesterolemiantă.* Viaţa med., 1962, **IX**, *3*, 149—159.

Se expune biochimismul normal şi patologic al colesterolului, precum şi relaţiile dintre colesterolemie şi ateroscleroză. Se prezintă schematizată sugestiv, evoluţia colesterolului în organism şi locul de acţiune a substanţelor hipocolesterolemiante. Urmează o încercare de clasificare a hipocolesterolemiantelor după mecanismul lor biochimic de acţiune : 1) reducerea de colesterol exogen : sitosterolii ; 2) reglarea transportului sangvin : heparina, heparinoidele, derivaţii protaminici ; 3) stimularea catabolismului sau grăbirea eliminării metaboliţilor colesterolului : acizi graşi nesaturaţi, clorotice, acidul nicotinic ; 4) inhibarea parţială a sintezei colesterolului : Mer 29, derivaţii de acid fenilacetic, estrogenii etc. Se analizează apoi acţiunea acestor substanţe.

D. Moţet-Grigoraş

1399. STOICULESCU P., *Metabolismul normal şi patologic al pigmenţilor biliari.* Viaţa med., 1962, **IX**, *9*, 449—464.

Se face o largă privire de ansamblu, ilustrată cu scheme şi date experimentale, indicîndu-se direcţiile principale de cercetare care se deschid în acest domeniu.

D. Moţet-Grigoraş

1400. PEIVE I. V., *Rolul microelementelor în metabolismul plantelor agricole şi în sporirea productivităţii lor.* An. rom.-sov., agr.-zoot., 1962, **XVI**, *3*, (67), 19—29.

Referat general cu 17 indicaţii bibliografice.

C. Săndulescu

1401. BORLAN Z. şi COSTAN GH., *Aplicarea tehnicii izotopilor radioactivi în cercetările horti-viticole din R.P.R.* An. rom.-sov., agr.-zoot., 1962, **XVI**, *3* (67), 75—87.

Se prezintă — pe baza unui bogat material bibliografic — perspectivele de folosire a izotopilor radioactivi în problemele de cercetare din sectorul horti-viticol.

C. Săndulescu

1402. PETROV R. V., *Rolul radiologiei în dezvoltarea studiului infecţiei şi imunităţii.* An. rom.-sov., biol., 1961, *4*, 60—81.

Referat general cu 100 de indicaţii bibliografice.

L. Arnet

1403. VARTA PETEAN B. B., *Un model simplificat al unui dispozitiv de laborator pentru uscarea, materialelor biologice prin metoda congelării şi uscării rapide.* An. rom.-sov., biol., 1961, *4*, 123—125.

Se descrie un dispozitiv relativ uşor de realizat şi de manipulat, care permite uscarea materialelor biologice prin congelare rapidă şi uscare ulterioară în stare congelată.

L. Arnet

1404. RUBIN A. B. şi ANTONOV A. S., *Se manifestă oare specificul vieţii la nivel molecular?* An. rom.-sov., biol., 1961, *6*, 3—8.

Referat general fără indicaţii bibliografice.

L. Arnet

1405. SISAKIAN N. M., *Funcţiile biochimice ale structurilor celulare.* An. rom.-sov., biol., 1961, *6*, 27—54.

Referat general cu 104 indicaţii bibliografice.

L. Arnet

1406. KRETOVICI V. L., *Concepţiile actuale cu privire la natura şi mecanismul acţiunii enzimelor.* An. rom.-sov., biol., 1962, *1*, 32—50.

Referat general cu 41 de indicaţii bibliografice.

L. Arnet

1407. MEDVEDEV S. A., *Îmbătrînirea organismului la nivel molecular.* An. rom.-sov., biol., 1962, *1*, 112—132.

Referat general cu 51 de indicaţii bibliografice.

L. Arnet

1408. ZEZEREV E. G. şi HRIPUNOVA I. I., *Metodă electrometrică de determinare a respiraţiei ţesulare.* An. rom.-sov., biol., 1962, *1*, 133—140.

Metoda descrisă este mai simplă din punct de vedere tehnic şi totodată mai sensibilă decît metoda manometrică a lui Warburg.

L. Arnet

1409. NIKOLAEV L. A., *Problemele evoluţiei biocatalizatorilor.* An. rom.-sov., chim., 1961, **XVI**, *4*, 100—136.

Referat general cu 79 de indicaţii bibliografice.

D. Moţet-Grigoraş

1410. SĂNDULESCU C., *Compoziţia şi structura proteinelor din cereale.* An. rom.-sov., chim., 1961, **XVI**, *4*, 149—163.

Referat general cu 37 de indicaţii bibliografice.

D. Moţet-Grigoraş

1411. TORCINSKI I. M., *Despre rolul grupelor -SH în formarea structurii catalitic active a enzimelor şi în mecanismul lor de acţiune.* An. rom.-sov., med., 1961, *5*, 81—108.

Referat general cu 128 de indicaţii bibliografice.

D. Moţet-Grigoraş

1412. SEIŢ I. F. şi LUGANOVA I. S., *Unele rezultate obţinute prin studierea biochimică a leucocitelor.* An. rom.-sov., med., 1961, *6*, 109—132.

Leucocitele reprezintă un material foarte comod şi interesant pentru studii biochimice experimentale. Se pot izola din organism cu păstrarea proceselor biochimice. În leucocite s-au pus în evidenţă toate substanţele chimice şi sistemele enzimatice de importanţă vitală care se găsesc în celelalte celule animale. Se prezintă 145 de indicaţii bibliografice.

D. Moţet-Grigoraş

1413. LEONTOVICI V. A. şi SUHOVA A. G., *Rolul fermenţilor proteolitici în distrugerea eritrocitelor sîngelui conservat.* An. rom.-sov., med., 1961, *6*, 145—150.

Autorii au constatat că nu numai eritrocitele vii de bou și iepure nu sînt lezate de tripsină, după cum au arătat Ballentine și Parpart, ci și cele de om rezistă proteinazei plasmatice active. Pe această bază, autorii afirmă că fermenții proteolitici ai sîngelui nu participă la distrugerea eritrocitelor în cursul unui proces îndelungat de conservare.

D. Moțet-Grigoraș

1414. CERNEAK N. B., *Compoziția chimică și metabolismul trombocitelor.* An. rom.-sov., med., 1962, *1*, 129—146.

Referat general cu 135 de indicații bibliografice.

D. Moțet-Grigoraș

1415. MEJEBOVSKI R. G., *Sistemul endocrin și insuficiența cardiacă.* An. rom.-sov., med., 1962, *1*, 147—152.

Se discută posibilitatea unei legături între sistemul endocrin și insuficiența cardiacă pe baza acțiunii fiziologice și biochimice a unor hormoni, cum sînt catecolaminele, corticosteroizii și tiroxina. Lucrarea prezintă și contribuții originale, și are 59 de referințe bibliografice.

D. Moțet-Grigoraș

1416. MAȘKOVSKI M. D., *Substanțele stimulante ale sistemului nervos central.* An. rom.-sov., med., 1962, *2*, 68—79.

Referat general fără indicații bibliografice.

D. Moțet-Grigoraș

1417. VIHLEAEV I. I. și LIUBIMOV B. I., *Substanțe farmacologice cu acțiune deprimantă centrală.* An. rom.-sov., med., 1962, *2*, 80—83.

Referat general fără indicații bibliografice.

D. Moțet-Grigoraș

1418. ZBARSKI I. B., *Particularitățile biochimice ale celulei tumorale.* An. rom.-sov., med., 1962, *2*, 103—122.

Referat general cu 92 de indicații bibliografice.

D. Moțet-Grigoraș

II. BIOCHIMIA PROTIDELOR

III. BIOCHIMIA GLUCIDELOR

IV. BIOCHIMIA LIPIDELOR

V. ENZIME

VI. VITAMINE. HORMONI. ALȚI COMPUȘI BIOACTIVI

1419. MILCU I., DAMIAN E. și IONESCU M., *Date în legătură cu respirația ovarului* în vitro *sub influența epifizhormonului.* Studii și cercet. endocrinol., 1961, *2*, 169—171.

Prin injecție subcutană de epifizhormon (corespunzînd la 2,5 mg azot/zi) timp de 4 zile consecutive, la iepuroaice adulte, respirația ovarelor (determinată la aparatul Warburg) nu este modificată semnificativ.

D. Cotariu

1420. ZEFIROVA G. S., *Rolul substanțelor adrenergice în patogenia bolii Addison.* Studii și cercet. endocrinol., 1961, *2*, 227—234.

S-au dozat substanțele adrenergice în sîngele a 10 bolnavi de boală Addison în formă pronunțată. Se constată o creștere importantă a lor la bolnavii netratați, în timp ce după tratamentul cu cortizon concentrația lor scade, atingînd uneori chiar valori normale. Acest test ar putea servi ca indice al eficacității tratamentului.

D. Cotariu

1421. POTOP I., CIOCÎRDIA C., JUVINĂ E. și ȘERBAN AL. M. D., *Variațiile fosfoproteinelor cerebrale sub influența tiroxinei, a hormonului tireotrop și a metiltiouracilului.* Studii și cercet. endocrinol., 1961, *2*, 245—247.

Experiențe efectuate pe șobolani albi masculi au arătat că tiroxina și hormonul tireotrop stimulează metabolismul fosfoproteinelor cerebrale (încorporarea de ^{32}P crește), în timp ce metiltiouracilul, substanță cu caracter antitiroidian, produce inhibarea acestora (reducerea încorporării de ^{32}P).

D. Cotariu

1422. SĂHLEANU V., HOLBAN R., SPITZ E. și MITRACHE L., *Eliminările urinare de Na și K la șobolanii epifizectomizați.* Studii și cercet. endocrinol., 1961, *2*, 253—255.

La șobolanii masculi ce au suferit epifizectomie cu 7 luni înainte de determinări, s-au dozat în urină Na și K prin fotometrie de flacără, în trei reprize, modificîndu-se de fiecare dată regimul alimentar al animalelor (deci și ingestia de Na și K). Analiza datelor obținute nu relevă diferențe semnificative.

D. Cotariu

1423. NEACȘU C., JUVINĂ E. și STĂTESCU L., *Date privitoare la acțiunea hormonilor sexuali asupra încorporării ^{32}P în scoarța cerebrală la șobolani.* Studii și cercet. endocrinol., 1961, *3*, 389—391.

Se studiază acțiunea hormonilor sexuali (prin tratament cu prolan, ovarectomie și suprarenalectomie) asupra vitezei de încorporare a ^{32}P în substanța albă și cenușie la șobolani; mecanismele complexe neuro-hormonale își găsesc expresia și prin modificările metabolismului fosforic în etajele superioare ale sistemului nervos central.

D. Cotariu

VII. BIOCHIMIA MICROBILOR. VIRUSURI. BACTERIOFAGI. ANTIBIOTICE. IMUNOCHIMIE

1424. NICOLAU ȘT. S., DRĂGĂNESCU N., BOERU V. și IONESCU N. I., *Cercetări spectrofotometrice în UV ale acidului ribonucleic extras din virusul gripal, inactivat cu ajutorul ionilor de cupru.* Studii și cercet. inframicrobiol., 1961, **XII**, *3*, 285—287.

Spectrul de absorbție în UV al acidului ribonucleic extras din virusul gripal inactivat cu azotit de cupru 0,05% nu diferă de cel al acidului ribonucleic și deci ionul de cupru nu se combină cu fracțiunea nucleică, ci cu aminoacizii prezenți.

D. Tănăsescu

1425. CAJAL N., BURDUCEA O. și ANDREESCU M., *Studiul valorii properdinei serice sub acțiunea radiofosforului (^{32}P) și radioiodului (^{131}I).* Studii și cercet. inframicrobiol., 1961, **XII**, *3*, 291—301.

Prin iradiere internă cu radiații β și γ realizată de ^{32}P și ^{131}I, properdina serică scade la șobolanul alb după 24 ore de la administrare, cu un maxim după 4 zile, acțiunea fiind mai evidentă în cazul ^{131}I. Datorită sensibilizării animalelor iradiate la acțiunea patologică a germenilor microbieni și inframicrobieni se dovedește rolul properdinei în rezistența nespecifică antivirotică.

D. Tănăsescu

1426. BURDUCEA O., SAMUEL I. şi CEPLEANU M., *Studiul electroforetic al serurilor de şobolani imunizaţi antigripal sub acţiunea radiofosforului* (^{32}P) *şi radioiodului* (^{131}I). Studii şi cercet. inframicrobiol., 1962, **XIII**, *1*, 89—96.

Administrarea izotopilor radioactivi şobolanilor imunizaţi nu influenţează producţia de anticorpi serici. Producţia de γ-globuline este inhibată într-o proporţie mai mică de ^{32}P şi mai intens de ^{131}I. După 4 zile se constată o scădere a β-globulinelor.

D. Tănăsescu

1427. PORTOCALĂ R., SAMUEL I. şi BOERU V., *Acţiunea unor agenţi fizici şi chimici asupra infectivităţii acizilor nucleici izolaţi din virusuri. I. Influenţa unor substanţe oxidante şi reducătoare asupra acidului nucleic extras din virusul MM.* Studii şi cercet. inframicrobiol., 1962 , **XIII**, *2*, 187—195.

Infectivitatea nu este influenţată de acţiunea aerului, oxigenului, hidrogenului, acidului ascorbic, cisteinei şi a glucozei. ARN inactivat prin conservare 24 de ore la temperatura camerei nu-şi recapătă activitatea şi nici nu i se poate împiedica inactivarea în prezenţa cisteinei, acidului ascorbic, glucozei, ceea ce face să se presupună că inactivarea nu se datoreşte unui proces oxidativ sau enzimatic, ci unui proces de fragmentare mecanică a moleculei de acid nucleic.

D. Tănăsescu

1428. PETRESCU AL., ATHANASIU P., ANDREESCU M. BOERU V., şi RUTTER G., *Modificări morfofuncţionale celulare la şoarecele alb în cursul imunizării antigripale. I. Studiul citochimic şi biochimic al acizilor nucleici şi al nucleazelor din ţesutul pulmonar.* Studii şi cercet. inframicrobiol., 1962, **XIII**, *2*, 217—221.

Acidul dezoxiribonucleic şi dezoxiribonucleaza din celulele pulmonare nu prezintă modificări după 48 de ore, 7 zile sau 14 zile de la vaccinare, în timp ce acidul ribonucleic şi ribonucleaza pulmonară scad după 7 zile, revenind la normal după 14 zile. Rezultatele sînt în concordanţă cu rolul infecţios atribuit acidului ribonucleic virotic gripal şi prezintă argumente noi în interpretarea imunităţii tisulare.

D. Tănăsescu

1429. BARBER C. et SOARE I., *Séparation d'un polymère constitué d'acide γ-aminobutyrique à partir de la* Bordetella pertussis, Arch. roum. pathol. expér., 1961, **XX**, *3*, 511—515.

Polimerul a fost extras cu ajutorul unei soluţii de dezoxicolat de sodiu 2% şi dă în reacţiile de difuzie în gel, una din cele 4—5 linii de precipitare care se obţin cu antigenul total faţă

de antiserul preparat cu germeni sau cu extracte microbiene ce conţin acest compus. Identificarea sa s-a făcut prin cromatografie pe hîrtie (irigare cu butanol-acid acetic-apă şi colidină-butidină-apă).

D. Tănăsescu

1430. PODHORSKI-COSTIN E. et TOPCIU A., *Étude chimique des antigènes extraits de différents types de méningocoques.* Arch. roum. pathol. expér., 1961, **XX**, *3*, 529–536.

Au fost studiate la trei tulpini de meningococ (A, B, C) rezidiile minerale, substanţele organice, lipidele totale, substanţele reducătoare înainte şi după hidroliză, acizii nucleici totali, acizii ribo- şi dezoxiribonucleici şi azotul liber, acidosolubil nucleic, aminic total, aminic liber, aminic polipeptidic. Se constată variaţii cantitative între aceste trei tulpini.

D. Tănăsescu

1431. BARBER C., *Le tampon véronal, moyen d'extraction des antigènes bactériens.* Arch. roum. pathol. expér., 1961, **XX**, *3*, 541–543.

Au fost izolate, din 6 germeni diferiţi, antigene complexe cu randamente importante. De asemenea în acest tampon (pH 8,4) se obţine un număr maxim de linii de precipitare în gel de agar între suspensiile bacteriene şi antiserurile omologe.

D. Tănăsescu

1432. SORU E., ISTRATI M., SZABADOS J., TĂNĂSESCO D. et PARASCHIVESCO M., *Le cycle des acides tricarboxyliques chez* Mycobacterium tuberculosis *atténué (BCG) et chez ses variantes résistantes à la streptomycine, au PAS et à l'hydraside de l'acide isonicotinique.* Arch. roum. pathol. expér., 1961, **XX**, *4*, 637–651.

S-au studiat enzimele fiecărei etape a ciclului, consumul de oxigen în prezenţa componentelor ciclului, a cetoacizilor şi a acizilor organici participanţi. Se observă că instalarea rezistenţei faţă de antibiotice este însoţită de o modificare evidentă a metabolismului.

D. Tănăsescu

1433. POPESCU AR., TICAN V. şi POPESCU L., *Cercetări electroforetice asupra seroproteinelor în cursul hiperimunizării antiaftoase a bovinelor.* Lucr. şt. Inst. Pasteur Buc., 1961, V, 59–65.

Albuminele serice au scăzut, probabil datorită sîngerărilor repetate. α-Globulinele au marcat o creştere uşoară, în timp ce β şi γ-globulinele au prezentat oscilaţii nesemnificative. Titrul anticorpilor fixatori de complement a rămas constant în timpul celor $3\,^1/_2$ luni de hiperimunizare. Nu s-a constatat o proporţionalitate directă între nivelul γ-globulinelor şi imunitate în febra aftoasă. Rolul primordial în imunitatea antiaftoasă se confirmă a fi datorat factorilor tisulari.

D. Tănăsescu

1434. POPESCU AR., DE SIMON M., ALBOIU M., CONSTANTINESCU C., BÎRNAURE G., URSACHE O. şi TEODORESCU-POPESCU L., *Prepararea concentratelor gamaglobulinice din seruri hiperimune.* Lucr. şt. Inst. Pasteur Buc., 1961, **V**, 305—315.

S-au experimentat trei procedee de purificare a serului hiperimun contra bolii lui Aujeszky. Studiul electroforetic a arătat următoarele: 1) prin metoda de fracţionare cu CO_2 dispar albuminele şi rămîn urme de α-globuline, 6,41% β-globuline şi 93,59% γ-globuline; 2) prin metoda cu rivanol dispar albuminele şi α-globulinele şi rămîn 22,06% β-globuline şi 77,97% γ-globuline; 3) prin metoda cu Na_2SO_4 dispar albuminele şi α-globulinele, rămînînd 3,24% β-globuline şi 96,76% γ-globuline. Se reuşeşte deci o îmbogăţire în γ-globuline de circa 3 ori faţă de serul nativ. Preparatele sînt perfect inoculabile, iar titrarea lor prin seroneutralizare dă rezultate de circa 10 ori mai bune decît serul nativ.

D. Tănăsescu

VIII. BIOCHIMIE VEGETALĂ

1435. GUDJU I. şi CONSTANTINESCU A., *Contribuţii la determinarea calitativă a alcaloizilor din unele preparate farmaceutice de opiu cu ajutorul electroforezei pe hîrtie.* Farmacia, 1961, **IX**, *3*, 143—147.

Prin electroforeza pe hîrtie, folosind ca electrolit soluţia 2 N de acid formic (pH 1,5), s-au pus în evidenţă următorii alcaloizi: criptopina, narcotina, papaverina, narceina, morfina, codeina în sensul migrării catodice şi acidul meconic, în sensul migrării anodice.

D. Moţel-Grigoraş

1436. DAVIDESCU D., BĂLĂNESCU I. şi CONSTANTINESCU GH., *Variaţia diurnă a azotului, fosforului şi potasiului în frunzele cîtorva specii de plante.* Lucr. şt. Inst. Agr. N. Bălcescu, seria A, 1961, **V**, 193—201.

Conținutul de N, P și K din frunzele de tomate, batat, sfeclă de masă și dud variază în timpul zilei și al nopții, cu tendință de scădere în cursul nopții și creștere în cursul zilei. Intensitatea luminii solare influențează pozitiv conținutul în azot din frunze, dar nu are nici o influență evidentă asupra conținutului de P și K din frunze.

H. Filipescu

1437. HOROVITZ C., STAN S., SOTIRIU V. și LASZLO I., *Influența regimului de apă asupra unor procese fiziologice la plantele de fasole în perioada înfloririi.* An. ICAR, seria C, 1960, **XXVIII**, 43–60.

Regimul scăzut de umiditate a solului înaintea înfloririi a avut ca efect, în perioada înfloririi, creșterea intensității respirației în comparație cu plantele martor, scăderea activității catalazei, creșterea conținutului de azot și scăderea conținutului de fosfor. Regimul scăzut de umiditate a solului în perioada înfloririi a provocat scăderea intensității respirației, creșterea activității peroxidazei și mărirea conținutului de azot și glucide, activitatea catalazei avînd variații neregulate.

H. Filipescu

1438. BRAD I. și VALUȚĂ GH., *Rezultatele obținute prin aplicarea iarovizării la cîteva plante agricole în R.P.R.* An. rom.-sov., agr.-zoot., 1962, **XVI**, *2* (66), 49–63.

Se prezintă cîteva rezultate ale cercetărilor întreprinse în anii 1957–1958 asupra proceselor ce au loc în timpul iarovizării. S-au determinat conținutul în substanțe reducătoare, activitatea catalazei și peroxidazei, consumul de O_2 și aciditatea titrabilă la două soiuri de grîu, în cinci variante, demonstrîndu-se influența iarovizării asupra metabolismului plantei. Se emite ipoteza că prin intervenirea cu substanțe care influențează metabolismul, s-ar putea micșora perioada de iarovizare, chiar la temperaturi mai puțin scăzute.

C. Săndulescu

1439. MEDVEDEV S. A., ZABOLOTKI N. N., TZIAN-SIA-SEN, MO SI-MU, DAVIDOVA E. G. și DAVIDOV E. R., *Izolarea acidului ribonucleic din sucul plasmatic al frunzelor și studiul particularităților lui metabolice.* An. rom.-sov., biol., 1961, *3*, 36–48.

Din sucul plasmatic al țesuturilor vegetale congelate, extras prin presiune și reprezentînd un ultrafiltrat al citoplasmei celulare, s-au preparat cantități mari de acid ribonucleic (ARN). Acest ARN posedă o viteză mult mai mare a metabolismului fosforului decît ARN din structuri. Dacă se include metionină $-^{35}S$ în componentele celulare, ARN din sucul plasmatic păstrează totdeauna după deproteinizare o radioactivitate evidentă, pe cînd ARN din structuri poate fi eliberat aproape complet de produșii marcați cu ^{35}S.

L. Arnet

IX. BIOCHIMIE ANIMALĂ

1440. ŞANTA N. şi GURBAN, C. *Rolul proceselor metabolice aerobe în fiziologia muşchilor netezi* Studii şi cercet. biol., biol. anim., 1961, **XIII**, *3*, 371–380.

În condiţii aerobe preparatele de stomac izolat de broască desfăşoară o activitate motorie susţinută, în lipsa oricărei surse energetice externe. În lipsa oxigenului, activitatea automată încetează foarte repede, producîndu-se şi abolirea „fenomenului paradoxal". Procesele metabolice aerobe sînt necesare atît pentru asigurarea automatismului şi a reactivităţii componentelor musculare netede, cît şi pentru întreţinerea activităţii componentelor nervoase vegetative intramusculare.

N. Luţă-Moldoveanu

1441. PORA E., SCHWARTZ A., MADAR I., GHIRCOIAŞU M., KIS Z., FELSZEGHY E., ABRAHAM A. şi KOVACS V., *Acţiunea insulinei şi a vitaminei B_2 asupra proceselor metabolice din diafragma izolată de şobolan.* Studii şi cercet. biol., biol. anim., 1961, **XIII**, *3*, 381–393.

În diafragmă încorporarea glucozei este favorizată atît de insulină, cît şi de riboflavină; cantitatea de glicogen este mărită de insulină şi diminuată de riboflavină, iar acţiunea simultană a ambelor substanţe activează sinteza glicogenului. Diafragma normală elimină în mediul de incubaţie serina şi acidul glutamic, în prezenţa insulinei elimină în plus acidul aspartic, glicina şi o fracţiune neidentificată (Rf = 0,13), iar în prezenţa vitaminei B_2: prolina, valina şi izoleucina. După incubare, omogenatele de diafragmă în prezenţa insulinei au în plus, faţă de normal, triptofanul şi fracţiunea neidentificată şi în minus acidul aspartic, glicina şi acidul glutamic; prin prezenţa simultană a ambelor substanţe, tabloul aminoacizilor devine mai complex, denotînd un proces de proteoliză mai accentuată.

N. Luţă-Moldoveanu

1442. MOTELICĂ I., *Acţiunea insulinei asupra glicemiei crapului (II).* Studii şi cercet. biol., biol. amin., 1961, **XIII**, *4*, 535–547.

Dozarea glucozei cu metoda Hagedorn-Jensen a arătat că alimentaţia glucidică şi o serie de stimuli reflexogeni provoacă o rapidă şi durabilă hiperglicemie, care poate fi înlăturată cu doze relativ mici de insulină. Dozele mari de insulină (< 20 U.I./Kg) provoacă o hipoglicemie profundă şi de lungă durată, dar nu şi apariţia şocului hipoglicemic. La crap pare să existe o relaţie strînsă între cantitatea de glucoză şi cea de insulină necesară pentru utilizarea acesteia, dar nu există o reglare promptă şi eficientă pentru asigurarea homeostazei glicemice.

N. Luţă-Moldoveanu

1443. VAISLER L. şi COSTINER E., *Excreţia bromsulfaleinei la animale cu ciroză experimentală a ficatului şi tratate cu vitamina B_{12}.* Studii şi cercet. endocrinol., 1961, *2*, 250—251.

Şobolanii albi cu ficat lezat prezintă o retenţie crescută de bromsulfaleină, ceea ce indică o alterare a funcţiei cromagoge a ficatului. Animalele care au primit vitamina B_{12} au funcţia cromagogă nealterată; apropierea cifrelor de media martorilor este în funcţie de doza de vitamină B_{12} administrată.

D. Cotariu

1444. VAISLER L. şi COSTINER E., *Excreţia bromsulfaleinei (BSF) la animale cu ciroză experimentală a ficatului şi tratate cu hormon epifizar.* Studii şi cercet. endocrinol., 1961, *2*, 252—253.

Şobolani albi cu ficat lezat, cărora li s-a administrat intraperitoneal BSF (5 mg din sol. 5 %), prezintă valori crescute ale colorantului în sînge, retenţie ce indică o alterare a funcţiei cromagoge a ficatului. Animalele tratate cu hormon epifizar în doze diferite (doza cea mai eficientă 1 ml) prezintă o excreţie a colorantului în limitele valorilor de la martori. Se evidenţiază rolul protector al hormonului epifizar asupra funcţiei cromagoge a ficatului.

D. Cotariu

1445. VAISLER L., BIENER J. şi COSTINER E., *Cercetări asupra funcţiei de conjugare a ficatului la animale cu ficat lezat şi tratate cu hormon epifizar.* Studii şi cercet. endocrinol., 1961, *3*, 339—343.

Experienţe efectuate pe cîini adulţi cărora li s-a administrat timp de 15 zile hormon epifizar (0,5 ml pe kg corp pe zi) au arătat că acesta are o acţiune protectoare a funcţiei de glucuronoconjugare, în cazul animalelor cu ficat lezat prin tetraclorură de carbon. Un efect similar al hormonului epifizar se observă la animalele cu leziuni hepatice vechi şi tratate cu tiroxină.

D. Cotariu

1446. BIENER J. şi VAISLER L., *Modificări biochimice în ficatul animalelor intoxicate cu tetraclorură de carbon şi tratate cu metiltiouracil.* Studii şi cercet. endocrinol., 1961, *4*, 481—485.

S-au efectuat experienţe pe şobolani albi normali, intoxicaţi cu CCl_4 şi intoxicaţi cu CCl_4 dar primind concomitent MTU. Se constată că MTU determină la animalele intoxicate creşterea capacităţii de retenţie a glicogenului hepatic. Administrat în doze mari, MTU prezintă şi un efect favorabil de protecţie contra infiltraţiei grase a parenchimului hepatic.

D. Cotariu

1447. SILVEANU R. A. şi KECSKENETY ST., *Variaţia potenţialului redox al musculaturii striate sub acţiunea unor medicamente.* Studii şi cercet. med., Timişoara, 1961, **VIII**, *1—2*, 127—139.

Cercetări pe cobai au arătat că d-tubocurarina, flaxedilul, atropina, piramidonul şi codeina produc pozitivarea potenţialului redox tisular faţă de nivelul anterior administrării, cu revenire la valoarea iniţială. Prostigmina şi 2, 4-dinitrofenolul injectate ca şi precedentele intramuscular, la cobai produc negativarea potenţialului redox tisular faţă de nivelul anterior administrării, cu revenire la valoarea iniţială. Aceste rezultate constituie un argument în plus pentru încadrarea primului grup de substanţe în grupul mare al antiasfixicilor aerobi şi a substanţelor din al doilea grup în cadrul asfixicilor aerobi.

L. Arnet

1448. RÎMNICEANU C., TUDOR L., LITUAC E., DINCĂ C. şi SUCS E., *Cercetarea prin metode de histochimie a acţiunii vitaminei B_{12} asupra metabolismului intermediar al celulei hepatice intactă şi lezată prin tetraclorura de carbon.* Studii şi cercet. med., Timişoara 1961, **VIII**, *3—4*, 212—220.

Sub influenţa vitaminei B_{12} se observă în celula hepatică de şobolan alb mascul, intactă şi lezată prin intoxicaţia cu tetraclorură de carbon un paralelism între modificările aparatului mitocondrial, ale citocromoxidazei şi ale acidului ribonucleic. Vitamina B_{12} acţionează ca protector faţă de ficat, nu numai ca adjuvant în terapeutică, aşa cum se consideră, ci ca un factor important în metabolismul intermediar al acidului ribonucleic, în sinteza proteinelor, în regenerare, în oxidarea respiratorie şi fosforilarea oxidativă, în mobilizarea grăsimilor, în faza leziunilor reversibile din hepatita toxică experimentală.

L. Arnet

1449. DEUTSCH G. şi DREICHLINGER O., *Influenţa carenţei de vitamină B_5 asupra transportului transtubular al acidului para-amino-hipuric.* Studii şi cercet. med., Timişoara 1961, **VIII**, *3—4*, 277—279.

Carenţa de vitamină B_5, realizată la un lot de 50 de şobolani, a dus la scăderea acumulării acidului para-amino-hipuric (PAH) în felii de ţesut renal. Aceste rezultate confirmă ipoteza după care coenzima A, în alcătuirea căreia vitamina B_5 ocupă un loc important, joacă un rol de seamă în procesul acumulării PAH în tubii renali.

L. Arnet

1450. SIMIONESCU N. şi GOLDSTEIN M., *Dinamica citochimică a medulosuprarenalei în şocul hemoragic experimental.* Chirurgia, 1961, **X**, *1*, 79—85.

Producîndu-se la cîine un șoc hemoragic experimental, s-au prelevat în diferite stadii de șoc, glandele suprarenale și s-au studiat citochimic. Evoluția modificărilor citochimice observate a arătat că, în faza de epuizare, se produce o inhibiție a funcției de metilare, cu pierderea capacității de transformare a noradrenalinei în adrenalină.

C. Șelariu

1451. PREDA V., CRISTEA M și CRĂCIUN O., *Rolul trofic al sistemului nervos embrionar. Nota III. Influența extirpării veziculelor cerebrale asupra unor proteine și asupra lipidelor din unele organe ale embrionului de găină.* Morfol. norm. pat., 1961, *3*, 193—199.

Prin experiențe de extirpare a veziculelor cerebrale la embrionul de găină Rhode-Island, autorii au ajuns la concluzia că la embrionul normal la vîrste tinere (8—12 zile) sinteza proteinelor este frînată în toate organele sale de influențe care vin de la sistemul nervos central, în special de la diencefal. La vîrste mai înaintate (15 zile) sinteza proteinelor este influențată de diencefal, în sensul unei accelerări. La embrionul normal, sinteza lipidelor este accelerată de influențe provenite de la toate veziculele cerebrale și în special de la mezencefal.

D. Cotariu

1452. NOVIKOV B. G., CEPINOGA O. P. și LIUBARSKAIA M. A., *Efectele injectării ADN eterogen la păsări.* An. rom.-sov., biol. 1962, *1*, 19—23.

Sub acțiunea unor injectări sistematice de ADN eterogen, la rațe apar transformări dirijate în sinteza ADN propriu, transformări ce se transmit primei generații.

L. Arnet

1453. ANANICEV A. V., *Caracteristica biochimică comparativă a unor nevertebrate și pești de apă dulce.* An. rom.-sov., biol., 1962, *1*, 51—65.

Particularitățile biochimice ale unor organisme de apă dulce, în funcție de apartenența lor la diverse grupe zoologice, constau nu numai în variabilitatea compoziției biochimice calitative, dar și în prezența sau absența diverșilor compuși din organism. Aceasta s-a pus în evidență cercetîndu-se, comparativ, la o serie de nevertebrate față de pești de apă dulce, compoziția lipidică, glucidică și nucleoproteidică.

L. Arnet

X. BIOCHIMIE MEDICALĂ

1454. POP AL., BĂLĂCEANU M., STAN M. și CIOVÎRNACHE A., *Diagnosticul și prognosticul tiroiditelor cu ajutorul determinării autoanticorpilor antitiroidieni.* Studii și cercet. endocrinol., 1961, *3*, 381—388.

Se studiază 30 de cazuri cu patologie tiroidiană din punct de vedere clinic, umoral, radiobiologic şi imunologic (reacţie de fixare a complementului cu ajutorul unui antigen complex, preparat din glande tireotoxice) şi se stabileşte că dozarea autoanticorpilor are atît valoare diagnostică, cît şi prognostică.

D. Cotariu

1455. NIŢESCU I., CONSTANTINESCU A., MIHĂIŢĂ M. şi CARIADI L., *Pierderi de ioni Fe prin sudoare în efort fizic la temperatură ridicată.* Studii şi cercet. fiziol., 1962, **VII**, *1*, 103—106.

Autorii constată, cu ajutorul metodei polarografice, că în condiţiile unei temperaturi ridicate, fierul ionic eliminat prin sudoare este aproximativ dublu în comparaţie cu cel din sudoarea normală şi că această eliminare creşte la muncitori neantrenaţi, ceea ce impune recuperarea prin aport alimentar.

H. D. Schell

1456. STERESCU N., COVĂSNEANU Z., GABRIELESCU E., STANCU A. şi BORDEIANU A., *Modificări biochimice în glanda tiroidă în cursul efortului fizic.* Studii şi cercet. fiziol., 1962, **VII**, *1*, 107—113.

Rezultatele experimentale obţinute pe 500 de şobolani şi cobai, dovedesc că simpla determinare a nivelului captării iodului radioactiv în tiroidă, ca indicator al stării funcţionale a acesteia, nu este satisfăcătoare, ea neputînd răspunde la toată complexitatea proceselor biochimice care au loc în această glandă.

H. D. Schell

1457. MARINESCU G., GALEA I., IOANESI I., TUDOR V., DOGARU D., NICOLAU G. şi MIHĂILESCU F., *Studiu asupra eliminării 17-cetosteroizilor în infecţia urliană.* Studii şi cercet. inframicrobiol., 1962, **XIII**, *3*, 197—201.

Din 28 cazuri, în 7 se constată o scădere marcată a 17-cetosteroizilor. Datele confirmă ipoteza lezării latente a corticosuprarenalei în cursul infecţiei neurocriniene urliene.

D. Tănăsescu

1458. MANOLIU N., VILĂU C., DANCU I. şi ANGELESCU C., *Activitatea transaminazică glutamic-oxalacetică şi glutamic-piruvică a serului în cursul hepatitei epidemice.* Studii şi cercet. inframicrobiol., 1962, **XIII**, *3*, 329—333.

S-a determinat activitatea transaminazică pe un număr de 100 de bolnavi, găsindu-se valori crescute în toate cazurile. În medie SGOT a fost de 8 ori mai mare, iar SGPT de 13,5 ori. Raportul SGOT/SGPT a fost în 99 de cazuri subunitar (0,58). În primele două săptămîni de boală, valorile sînt crescute în 100% din cazuri, iar după 5—6 săptămîni valorile ajung la normal sau rămîn uşor crescute. Se pare că există un raport între valoarea bilirubinei şi a transaminazelor.

D. Tănăsescu

1459. TURCU I., BÎLCU CL., SCAFEŞ S. şi MĂCĂRESCU O., *Cercetarea catalazei serice în hepatita epidemică.* Studii şi cercet. inframicrobiol., 1962, **XIII**, *3*, 386—390.

Au fost observate valori mai mici ale catalazei numai în formele grave. Nu s-au observat modificări în scarlatină, rujeolă, parotidită epidemică.

D. Tănăsescu

1460. BUŞILĂ V. T., VENTURINI E. şi ELIAS S., *Asupra corelaţiei dintre disproteinemie, imunitate şi evoluţia clinică în cursul antibioterapiei tusei convulsive.* Studii şi cercet. med., Timişoara, 1961, **VIII**, *1—2*, 149—162.

În cursul tusei convulsive, înainte de antibioterapie, în mod inconstant se înregistrează modificări ale proteinogramei în sensul hipoalbuminemiei, hiper-α_2- şi hiper-γ-globulinemiei. Sub influenţa antibioterapiei cu streptomicină şi penicilină, modificările proteinogramei diferă în raport cu evoluţia clinică. În cazul evoluţiei clinice favorabile se observă tendinţa de revenire la valorile relative normale, iar în cazul evoluţiei nefavorabile, modificările ce au precedat antibioterapia se accentuează. Antibioterapia nu influenţează evoluţia anticorpilor antipertussis, dinamica acestora prezentînd oscilaţii individuale mari, necorelabile cu celelalte elemente investigate. Totuşi datele valorilor medii arată diferenţe între grupuri de bolnavi cu evoluţie clinică bună sau staţionară. Disproteinemia în cursul infecţiei pertussis traduce persistenţa proceselor proliferativ-inflamatorii mai mult decît imunogeneza şi astfel prezintă deosebită valoare prognostică.

L. Arnet

1461. CRIŞAN T., ACHIM V., DEAC C., FLOREA E., LITAN I., OŢELEANU N., CHICOMBAN N. şi VOICU N., *Consideraţii asupra reacţiei cu azotit de sodiu ca test de efort.* Cultură fizică şi sport, 1962, **XV**, *1*, 47—49.

Folosind o tehnică simplă de evaluare vizuală a intensităţii coloraţiei produse prin adăugarea de nitrit în mediu de HCl în urină, autorii au constatat intensificarea considerabilă a reacţiei după curse cicliste de 30—50 km. La subiecţii cu reacţii foarte intense după efort, comportarea sportivă în ziua următoare este slabă. Substanţa responsabilă de producerea culorii ar fi în principal acidul 3-indolilacetic, provenit din degradarea triptofanului.

G. Haralambie

1462. PELIKAN V., KALÁB M., NOVOSADOVÁ J. şi JIRKA Z., *Cercetări asupra metabolismului triptofanului în cursul efortului fizic.* Cultură fizică şi sport, 1962, **XV**, *1*, 50—51.

După administrarea a 5 g de dl-triptofan, eliminarea acidului xanturenic creşte considerabil la om în efortul de diferite tipuri. În aceeaşi situaţie, suplimentarea cu vitamină B_6 face ca această creştere să fie mai redusă.

G. Haralambie

1463. GALEA GH., NIŢU V., HOANCĂ O., GALEA I., POPESCU A. şi ENACHE M., *Contribuţii la studiul citonecrozei hepatice.* Med. int., 1962, **XIV**, *4*, 445—454.

Autorii pornesc de la ideea că studiul enzimelor serice poate da un tablou al modificărilor biochimice suferite de celula hepatică în necroză. Studiind şi fierul seric, porfirinele urinare, aminoaciduria şi acidul uric în urină, se completează tabloul dat de transaminaze, aldolaze, fosfohexoizomerază, lactodehidrogenază, izocitricdehidrogenază, fosfataza alcalină din ser. Se ajunge la concluzia că o activitate modificată a enzimelor nu reflectă întotdeauna o necroză a celulei hepatice şi că „biopsia biochimică" rămîne încă o noţiune de interes teoretic.

C. Şelariu

1464. PĂUN R., MĂRCUŞ N., ILIE E. şi LAZAROVICI M., *Contribuţii la relaţia dintre metabolismul acidului oxalic şi afecţiunile hepatice.* Med. int., 1962, **XIV**, *4*, 455—460.

Pe 50 de cazuri de hepatită cronică evolutivă s-a arătat o creştere a oxalemiei în 62% din cazuri, o creştere a concentraţiei urinare a oxalaţilor în 58% din cazuri. Autorii explică creşterea sangvină fie printr-o tulburare a metabolismului glucidic, fie a metabolismului glicocolului, iar creşterea urinară prin interdependenţa între litiaza renală şi afecţiunile hepatice cronice.

C. Şelariu

1465. DUMA D., POPOVICIU L., BOROŞ TR., OPINCARU A., POP D. şi POPA D., *Cercetări electroforetice în afecţiunile vasculare cerebrale.* Neurol., psih., 1961, **VI**, *4*, 321—329.

Investigaţiile electroforetice aduc un preţios element de diagnostic şi de apreciere a rezultatelor terapeutice în afecţiunile vasculare de origine aterosclerotică, permiţînd surprinderea unora dintre ele în faza iniţială, preclinică şi funcţională. Lipemia şi lipidograma sînt de o valoare indiscutabilă, în timp ce protidograma oferă date mai puţin specifice şi caracteristice.

N. Luţă-Moldoveanu

1466. CIORTEA M., STADLER E. şi HECSER L., *Consideraţii asupra modificărilor valorice ale colesterolemiei la muncitorii dintr-o secţie de fabricat cuie.* Otorinolaring., 1962, **VII**, *2*, 157—160.

La muncitorii care lucrează într-o secție de fabricat cuie se constată o colesterolemie scăzută. Scăderea colesterolemiei este cu atît mai mare cu cît stagiul de muncă în mediu zgomotos și cu trepidații intense este mai îndelungat.

H. D. Schell•

1467. MAȘCA-CIOBANU L., *Studiul asupra metabolismului fierului în cursul evoluției reumatismului Sokolski-Bouillaud la copil.* Pediatria, 1961, **X**, *6*, 511—516.

Pe baza unui studiu histo- și biochimic (determinarea pigmenților biliari în sînge și urină și a rezistenței osmotice a hematiilor) se deduce că anemia care apare la această formă reumatismală este datorită blocării fierului în sistemul reticulo-histiocitar.

S. Mihăescu

1468. RĂZVAN B. și IZVORANU M., *Studiul electroforetic al proteinelor sangvine în astmul infantil.* Pediatria, 1961, **X**, *6*, 525—530.

Electroforegramele se caracterizează printr-o hiper-α_2- și γ-globulinemie în perioada acută a bolii. Revenirea la normal se face lent.

S. Mihăescu

1469. TUDORANU G., BARAN E., BARAN T. și POPESCU C., *Observații asupra modificărilor electroforetice ale serului în unele hemopatii maligne.* Rev. medico-chirurgic., Iași, 1961, **LXV**, *1*, 19—25.

Modificările electroforetice în hematopatiile maligne nu sînt patognomonice. În leucozele acute autorii constată scăderea albuminelor și creșterea α- și γ-globulinelor, în leucozele limfatice și mieloidice cronice se constată o creștere mică a α_1- și γ-globulinelor, în boala Hodghin α_2-globulinele cresc în puseele acute. Asemănarea acestor modificări cu cele din infecții pune problema unei etiologii comune infecțioase, așa după cum susțin unii autori.

A. Batcu

1470. STRAT C., RUSSU G., MARDARE G., DRĂGAN M. și ȘERBAN F., *Aspecte chimice și terapeutice ale hiperlipemiei esențiale.* Rev. medico-chirurgic., Iași, 1961, **LXV**, *3*, 599—604.

Un caz (literatura pînă în 1958 descrie 91 cazuri) interesant în 1959, prezintă lipidele totale în ser 22 $g^0/_{00}$, fosfolipide 4 $g^0/_{00}$ și colesterol total 4,41 $g^0/_{00}$. Lipidograma efectuată arată o creștere a lipidelor totale, cu precădere a celor aflate în zona α_2 și β; timol 44 u, iar celelalte

teste de insuficiență hepatică negative. Administrarea de acizi grași esențiali timp de 11 luni determină scăderea lipidelor la 11,6 g, a colesterolului la 2,50 g și a fosfolipidelor la 0,70 g‰, dar aceste modificări sînt temporare.

A. Batcu

1471. HUTTMANN A. și GHERASE C., *Contribuții la problema diagnosticului clinic al aterosclerozei.* Rev. medic., Tg. Mureș, 1960, **VI**, *4*, 414—418.

Pentru determinarea lipoproteinelor serice, autorii au efectuat reacția Knüchel la bolnavi suferind de hipertensiune arterială. Dintre aceștia, 28,7% au prezentat valori crescute de colesterol (peste 220 mg%) în timp ce la 40 % reacția Knüchel a fost pozitivă. Prin asocierea celor două probe, s-au pus în evidență modificări patologice într-o proporție de 51,2%.

D. Moțet-Grigoraș

1472. KEREKES M., MAJOR M. și KISS E., *Date noi asupra originii factorilor proteolitici din salivă.* Stomatol., 1962, **IX**, *1*, 5—7.

Activitatea proteolitică a salivei s-a determinat colorimetric (cu reactiv Folin-Ciocîlteu), întrebuințînd ca substrat cazeină 1% în fosfat de sodiu bibazic M/10 de pH 7,8. Rezultatele au arătat că numai o parte a acestei activități este de origine bacteriană, cealaltă fiind de origine secretorie. Datele prezintă importanță în etiologia cariilor dentare.

S. Mihăescu

1473. GOLDENBERG B., MIHĂILESCU M., și WECHSLER B., *Valoarea explorării funcțiilor hepatice în diagnosticul și tratamentul unor forme de menometroragii.* Viața med., 1962, **IX**, *6*, 295—300.

Cercetîndu-se cu ajutorul testelor biochimice starea funcțională a celulei hepatice, s-a scos în evidență legătura directă dintre starea acestei celule (insuficiențe hepatice de diferite grade) și manifestarea patologică a stării hiperfoliculinice secundare (sindrom menometroragic). Ca urmare, tratamentul corect al insuficienței hepatice decelate a dus, în toate cele 23 de cazuri studiate, la vindecarea menometroragiilor, cu o normalizare a funcției genitale.

D. Moțet-Grigoraș

1474. VASILIU V., *Anorexie la copil prin aport mărit de vitamină D_2.* Viața med., 1962, **IX**, *7*, 365—368.

Aportul crescut de vitamină D_2 poate provoca anorexia la copil. Același fenomen este dat și de perturbarea echilibrului fosfocalcic în sensul unui sindrom Lightwood. Confuziile pot

duce la terapie cu vitamină D_2 în cazuri neindicate, ceea ce agravează și periclitează dezvoltarea somatică și psihică a copilului. Administrarea vitaminei D_2 trebuie să se facă sub strict control medical.

D. Moțet-Grigoraș

1475. SIDORENKOV M. I., *Însemnătatea clinică a determinării aminoferazelor serului sangvin în insuficiența coronariană.* An. rom.-sov., med., 1961, *6*, 140—144.

Nivelul aminoferazelor are o mare însemnătate pentru diagnosticul infarctului miocardic în primele zile de apariție a bolii. O creștere simultană însemnată a ambelor aminoferaze la bolnavii de infarct miocardic are un prognostic grav.

D, Moțet-Grigoraș

1476. MEERSON F. Z. și RAIHLIN N. T., *Unele modificări histochimice în miocard în hiperfuncția compensatorie a inimii.* An. rom.-sov., med., 1961, *6*, 151—157.

În primul stadiu se observă următoarele modificări ale localizării și activității succindehidrazei și DPN- și TPN-diaforazelor : dispariția distribuirii inegale a enzimelor în diferite grupe de fibre musculare, apariția în miocard a unor zone mici complet lipsite de activitate, apariția activității succindehidrazei în pereții vasculari și în țesutul conjunctiv perivascular. În stadiul al doilea de hiperfuncție compensatorie stabilă dispar aceste modificări, dar se găsește o creștere a activității acestor enzime în zonele cu hipertrofie marcată a miocardului. Aceasta concordă cu ipoteza că creșterea activității enzimelor oxidoreducătoare este unul din factorii ce compensează deficitul capilarelor în inima hipertrofiată.

D. Moțet-Grigoraș

1477. BELOVINȚEVA M. F., *Secreția de insulină în unele tulburări funcționale ale ficatului.* An. rom.-sov., med., 1962, *2*, 142—148.

După operația care modifică locul de pătrundere a insulinei în sistemul port, se produce modificarea concentrației acestui hormon în sîngele periferic : concentrația hormonului este crescută pe nemîncate, iar ca răspuns la administrarea de glucide ca excitant natural, eliminarea reflexă a insulinei în sînge este scăzută. Deci, prin operația care deviază pătrunderea insulinei în ficat, se determină modificări ale sintezei glicogenului de către ficat, precum și ale secreției pancreatice endocrine.

D. Moțet-Grigoraș

XI. BIOCHIMIA NUTRIȚIEI

XII. BIOCHIMIE TEHNICĂ

XIII. FARMACOLOGIE. TOXICOLOGIE

1478. POPOVICI I. și BÎRZĂ E., *Cercetări comparative asupra acțiunii anticolinesterazice a Neguvonului și a unui produs similar romînesc — Hipoderminul.* Probl. zoot. vet., 1962, *3*, 40—45.

Prin administrarea Neguvonului, respectiv a Hipoderminului, nivelul colinesterazemiei scade la 40% după 4 ore de la administrarea unei doze terapeutice obișnuite, respectiv la 56—58% din valoarea normală înregistrată înainte de tratament. Scăderea este mai accentuată la administrarea dozelor duble (24%, respectiv 30—36%) și la cele triple (20% respectiv 11—14%).

H. Filipescu

ŞEDINŢELE CERCULUI DE BIOCHIMIE GENERALĂ ŞI APLICATĂ AL INSTITUTULUI DE BIOCHIMIE AL ACADEMIEI R.P.R. ŞI CATEDREI DE BIOCHIMIE DE LA UNIVERSITATEA BUCUREŞTI

În ziua de 30 mai 1962 a avut loc la Institutul de biochimie, şedinţa prezidată de acad. E. Macovschi, cu următoarea ordine de zi:

1. Acad. E. Macovschi, I. Steopoe şi S. Ceauşescu (Institutul de biochimie şi Facultatea de şt. naturale): *Cercetarea structurii coacervatelor prin metoda citologică.* Lucrarea s-a publicat în nr. 3 din 1962 al revistei.
2. G. Enăchescu (Institutul de cercet. horti-viticole): *Câteva aspecte ale metabolismului acidului ascorbic în* Solanaceae.
   Lucrarea s-a publicat în nr. 2 din 1962 al revistei.
3. I. Vasilescu şi G. Boltaşu (Institutul de cercetări alimentare): *Producerea riboflavinei prin biosinteză.*
   Lucrarea s-a publicat în nr. 3 din 1962 al revistei.
4. V. Gheţie şi D. Moţet-Grigoraş (Institutul de biochimie): *Electroforeza şi imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză.*
   Lucrarea s-a publicat în nr. 3 din 1962 al revistei.

ŞEDINŢELE CERCULUI DE BIOCHIMIE MEDICALĂ AL INSTITUTULUI DE BIOCHIMIE AL ACADEMIEI R.P.R. ŞI UNIUNII SOCIETĂŢILOR DE ŞTIINŢE MEDICALE — FILIALA BUCUREŞTI

În ziua de 12 iunie 1962 a avut loc la Uniunea societăţilor de ştiinţe medicale, şedinţa prezidată de prof. dr. I. Niţescu, cu următoarea ordine de zi:

1. Acad. E. Macovschi şi Corina Iordache (Institutul de biochimie): *Nivelul fosfagenului în diferite stări funcţionale ale muşchiului.* Lucrarea s-a publicat în nr. 2 din 1962 al revistei.
2. Georgeta Mihail (Clinica de pediatrie Fundeni): *Metabolismul magneziului şi o metodă nouă de determinare în ser.*

Problemele prezentate în legătură cu metabolismul magneziului privesc absorbția, circulația și excreția. S-a acordat un interes deosebit dozării magneziului în mediu biologic și referatul a prezentat o metodă complexometrică de dozare a magneziului în ser, care poate fi utilizată pentru analize în serie. Se dozează într-o probă calciu, întrebuințîndu-se indicator murexid, iar paralel în altă probă se titrează suma calciu + magneziu în prezență de eriocrom T, păstrîndu-se următoarele condiții: 1) pentru fiecare probă trebuie să se utilizeze minimum 2 ml ser; 2) soluția de complexon să fie milimolară; 3) să se întrebuințeze soluția tampon de NH_4OH/NH_4Cl cu pH 10.

Rezultatele obținute sînt: pentru calciu $\frac{\text{ml complexon} \times 0{,}004 \times 100}{\text{ml ser utilizați la analiză.}}$

Pentru magneziu valorile sînt diferența între cele două probe, adică:

$$\frac{(N_1 - N) \cdot 0{,}00243 \cdot 100}{\text{ml ser luați în lucru}} = \text{mg Mg\%}.$$

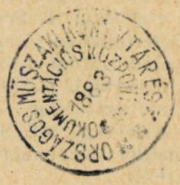
în care: N — ml de soluție complexon utilizați la titrarea probei pentru calciu, iar N_1 — ml complexon utilizați pentru titrarea sumei calciu + magneziu.

3. Dita Cotariu (Institutul de biochimie): *Hidroliza triptică a proteinelor acvosolubile din creier*). Lucrarea s-a publicat în nr. 2 din 1962 al revistei.

F 1330

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

INSTITUTUL DE BIOCHIMIE



STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul V 1962

INDEX ALFABETIC

	Nr.	Pag.
ALEXANDRESCU VICTORIA, Localizarea activităţii amilazei şi invertazei pe fracţiunile proteice solubile din seminţele de porumb.	1	7
ALEXANDRESCU VICTORIA, Localizarea activităţii amilazei şi invertazei pe fracţiunile proteice solubile din seminţele de porumb în timpul încolţirii	3	399
ANIŢIA N., ILLE C. şi VOICULESCU MARIA, Variaţia nicotinei din foile de tutun pe etaje, sub influenţa azotului din sol	2	235
ANTOHI S. şi ANTOHI MARIA, Dispozitiv de electroforeză microscopică pentru particule biologice în suspensie	1	117
ARNET LIA, Inhibarea prin uree a peroxidazei din frunzele de porumb şi efectul protector al ionilor de cupru	1	17
BODEA C. şi LÁSZLÓ T., Cercetări asupra caracterelor biochimice speciale ale porumbului. II. Despre potenţialul redox al boabelor de porumb . . .	3	351
BODEA C. şi TĂMAŞ V., Transformarea zeaxantinei în eschscholtzxantină şi mutatoxantină sub acţiunea tetraacetatului de plumb	3	359
BRAD I., LÁSZLÓ IULIA, VALUŢĂ GH. şi MICLEA CLEMENŢA, Influenţa transplantării embrionului de orz pe endospermul de secară asupra unor procese biochimice la hibrizi, în corelaţie cu rezistenţa la ger	4	551
BURUIANĂ L. M. şi HADARAG EL., Modificări adaptive ale fosfomonoesterazei eritrocitare în cursul evoluţiei filogenetice	3	377
BURUIANĂ L. M., HADARAG EL. şi PAVLU V., Cercetări cu privire la proteinele din plasma seminală	4	507
BURUIANĂ L. M. şi PAVLU V., Efectul radiaţiilor asupra proteinelor. VI. Influenţa radiaţiilor γ asupra proteinelor din cristalin	3	365
BURUIANĂ L. M. şi PAVLU V., Efectul radiaţiilor gamma (^{60}Co) asupra catalazei	4	517
CATRINA I., SCHELL D. H., IORDACHE CORINA şi NIŢU CORNELIA, Cercetări fiziologice şi biochimice în legătură cu fenomenul de uscare a stejarului	1	25
CÂRSTEANU MIOARA, Influenţa coacervatului ser-gumă arabică asupra activităţii catalazei hepatice de cal şi a catalazei extrase din grîu	1	39
COSTĂCHEL O., FURNICĂ M. şi DRAGON V., Formarea peroxizilor lipidici în ţesuturile şobolanilor iradiaţi şi radioprotejaţi	2	219

COTARIU DITA, Hidroliza triptică a proteinelor acvosolubile din creier . . . 2 263
DUMITRU I. F., Biochimia creierului. I. Separarea fosfolipidelor din creier pe coloană de silicagel. Determinarea vitezei de refacere a diferiților componenți fosfolipidici, folosind izotopi radioactivi (^{14}C) 3 435
DUMITRU I. F., Biochimia creierului. II. Studii asupra cantității și vitezei de refacere a lipidelor totale din creier 4 561
DUMITRU I. F., Biochimia creierului. III. Studiul vitezei de refacere a fosfolipidelor totale și principalilor componenți fosfolipidici din creier cu ajutorul carbonului radioactiv (^{14}C) 4 573
ENĂCHESCU GEORGETA, Cîteva aspecte ale metabolismului acidului ascorbic la solanacee 2 245
ENĂCHESCU GEORGETA, ȘOLDEA I. și MARINESCU RODICA, Modificările biochimice ale bulbilor de ceapă în timpul iernii 1 47
FURNICĂ M. și FURNICĂ G., Studii biochimice asupra procesului de radioprotecție 2 251
FURNICĂ M. și SPIRIDON M., Viteza de peroxidare a omogenatelor de țesuturi la iradierea *in vitro* 3 447
GEORGESCU P.și CONSTANTINESCU ELENA, Micrometodă pentru dozarea colesterolului total, esterificat și liber 4 595
GHEȚIE VICTOR și BUZILĂ LUCIA, Crioproteinele vegetale. Notă preliminară 1 65
GHEȚIE VICTOR și BUZILĂ LUCIA, Cercetări imunochimice asupra germinației la bob (*Vicia faba*) 4 541
GHEȚIE VICTOR și MOȚET-GRIGORAȘ DAN, Electroforeza și imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză 3 409
GURBAN C. și CRISTEA ELENA, Influența decuplanților, a inhibitorilor transportului de electroni și a concentrației substratului asupra cîtului de fosforilare cu succinat. 3 415
GURBAN C. și CRISTEA ELENA, Influența timpului de incubare asupra valorii cîtului de fosforilare cu succinat 3 423
HARALAMBIE G., Reacția urorozeinei în efortul fizic 1 77
IDU S. M., COCIUMIAN LUCIA și GEORGESCU VL., Reținerea albastrului de bromfenol de către fracțiunile proteice serice în prezența unor fixatori 2 271
KIȚULESCU I. și BĂLUȚĂ V., Date biochimice în legătură cu semnificația activității catepsinelor din țesuturile canceroase și necanceroase 2 227
MACOVSCHI EUGEN, Unele perspective ale cercetării biochimice în domeniul hibridării vegetative a plantelor 2 193
MACOVSCHI EUGEN și IORDACHE CORINA, Nivelul fosfagenului în diferite stări funcționale ale mușchiului 2 207
MACOVSCHI E., MIHĂESCU A. și POPESCU A., Procedeu pentru măsurarea endosmozei iodului în colul uterin 1 113
MACOVSCHI EUGEN, RĂDULESCU TRAIAN și SCOLNIC LORA, Exosmoza fosfaților de test al stării mușchiului 4 485
MACOVSCHI E., STEOPOE I. și CEAUȘESCU S., Cercetarea structurii coacervatelor prin metoda citologică 3 323
MEZINCESCU M. D., POPESCU-ȘTEFĂNESCU A., CRISTEA E. și DINU I., Metodă pentru studiul variațiilor contingente ale nevoii de azot . . . 4 527
MOȚOC FLORICA și CONSTANTINESCU SMARANDA, Capacitatea de transaminare a ficatului în cursul procesului neoplazic 1 91
OERIU S., COSTESCU G., TEODORESCU O. și ȘOIMU I., Studiul activității cocarboxilazei, transaminazei și al capacității de transacetilare în procesele de îmbătrînire 3 337
OERIU S., GRIGORESCU G. și MĂNESCU M., Dinamica fosforului lipidic în funcție de vîrsta animalului și sub acțiunea unor substanțe proprii organismului 3 347
OERIU S., TĂNASE I. și DINU V., Studiul aminoacidemiei în tuberculoza experimentală la cobai. 3 331
OERIU S., TIGHECIU-DUMITRESCU M. și ENACHE-PEREDERI L., Studiul activității unor enzime de oxido-reducere în procesele de îmbătrînire . . 3 343
ONEȘANU D., O metodă fotometrică pentru dozarea 11α-hidroxiprogesteronei din medii fermentate 3 453

PĂUNESCU EUG., Corelații între structura chimică, potențialul oxidoreducător și activitatea tuberculostatică a unor chimioterapice (etionamida, hidrazida I. N., tiosemicarbazona, acidul ascorbic) 4 587
SORU EUGENIA și IONESCU STOIAN FLORICA, Purificarea hialuronat liazei prin cromatografie pe DEAE-Sephadex 4 497
ȘELARIU C. și MIHĂESCU S., Repartiția transaminazelor pe fracțiunile electroforetice ale proteinelor solubile din mitocondriile de creier și ficat de șobolan 1 97
ȘORM F., Proteinele, structura și funcția lor 2 171
VASILESCU I. și BOLTAȘU G., Producerea riboflavinei prin biosinteză . . 3 383
ZAHARIA ODETTE, Oxidarea unor aminoacizi în prezența sistemului polifenoloxidazic din plante 1 103

АКАДЕМИЯ РУМЫНСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

ТРУДЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ ПО БИОХИМИИ

Том V 1962

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

	№	стр.
АЛЕКСАНДРЕСКУ ВИКТОРИЯ, Локализация активности амилазы и инвертазы по белковым фракциям семян кукурузы	1	7
АЛЕКСАНДРЕСКУ ВИКТОРИЯ, Локализация активности амилазы и инвертазы в растворимых белковых фракциях семян кукурузы во время прорастания	3	399
АНИЦИЯ Н., ИЛЛЕ К. и ВОЙКУЛЕСКУ МАРИЯ, Изменение содержания никотина в листьях табака на различных уровнях под влиянием почвенного азота	2	235
АНТОХИ С. и АНТОХИ МАРИЯ, Прибор микроскопического электрофореза для биологических частиц суспензии	1	117
АРНЕТ ЛИЯ, Торможение мочевиной пероксидазы из листьев кукурузы и предохраняющий эффект ионов меди	1	17
БОДЯ К. и ЛАСЛО Т., Исследования специальных биохимических характеристик кукурузы. II. О редокс-потенциале зерен кукурузы	3	351
БОДЯ К. и ТЭМАШ В., Превращение зеаксантина в эшшольцксантин и мутатоксантин под влиянием тетрацетата свинца	3	359
БРАД И., ЛАСЛО ЮЛИЯ, ВАЛУЦЭ Г., МИКЛЯ КЛЕМЕНЦА, Влияние пересадки зародыша ячменя на эндосперм ржи на некоторые биохимические процессы у гибридов в связи с морозостойкостью	4	551
БУРУЯНЭ Л. М. и ПАВЛУ В., Влияние излучений на белки. VI. Влияние лучей на белки хрусталика	3	365
БУРУЯНЭ Л. М. и ПАВЛУ В., Эффект, оказываемый гамма-излучениями (^{60}Co) на каталазу	4	517
БУРУЯНЭ Л. М. и ХАДАРАГ ЕЛ., Адаптивные изменения эритроцитной фосфомоноэстеразы во время филогенетической эволюции	3	377
БУРУЯНЭ Л. М., ХАДАРАГ ЕЛ. и ПАВЛУ В., Исследования белков семенной плазмы	4	507
ВАСИЛЕСКУ И. и БОЛТАШУ Г., Получение рибофлавина в процессе биосинтеза	3	383
ГЕЦИЕ ВИКТОР и БУЗИЛЭ ЛУЧИЯ, Растительные криопротеины. Предварительное сообщение	1	65

	№	Стр.
ГЕЦИЕ ВИКТОР и БУЗИЛЭ ЛУЧИЯ, Иммунохимические исследования прорастания у бобов (Vicia faba)	4	541
ГЕЦИЕ ВИКТОР и МОЦЕТ-ГРИГОРАШ ДАН, Электрофорез и иммунодиффузия белков в геле агарозы	3	409
ГУРБАН К. и КРИСТЯ ЕЛЕНА, Влияние декуплирующих веществ, ингибиторов переноса электронов и концентрации субстрата на результат фосфорелирования в присутствии сукцината	3	415
ГУРБАН К. и КРИСТЯ ЕЛЕНА, Влияние оказываемое продолжительностью инкубации на значение отношения фосфорелирования в присутствии сукцината	3	423
ДЖЕОРДЖЕСКУ П. и КОНСТАНТИНЕСКУ ЕЛЕНА, Микрометод для определения общего, этерифицированного и свободного холестерола	4	595
ДУМИТРУ И. Ф., Биохимия мозга. I. Разделение фосфолипидов мозга на колонке силикагеля. Определение скорости обновления различных фосфолипидных компонентов при помощи радиоактивных изотопов (^{14}C)	3	435
ДУМИТРУ И. Ф., Биохимия мозга. II. Исследование количества фракции общих липидов мозга и скорости их восстановления	4	561
ДУМИТРУ И.Ф., Биохимия мозга. III. Изучение скорости восстановления общего содержания фосфолипидов и главных фосфолипидных составляющих мозга при помощи радиоактивного углерода ^{14}C	4	573
ЕНЭКЕСКУ ДЖЕОРДЖЕТА, ШОЛДЯ И. и МАРИНЕСКУ РОДИКА, Биохимические изменения луковиц лука в зимнее время	1	47
ЕНЭКЕСКУ ДЖЕОРДЖЕТА, Некоторые особенности обмена аскорбиновой кислоты у пасленовых	2	245
ЗАХАРИЯ ОДЕТТ, Окисление некоторых аминокислот в присутствии полифенолоксидазной системы растений	1	103
ИДУ С. М., КОЧУМИАН ЛУЧИЯ и ДЖЕОРДЖЕСКУ ВЛ., Сохранение синего бромфенола растворимыми белковыми фракциями в присутствии некоторых фиксаторов	2	271
КИЦУЛЕСКУ И. и БЭЛУЦЭ В., Биохимические данные, связанные с активностью катепсинов в раковых и нераковых тканях	2	227
КОСТЭКЕЛ О., ФУРНИКЭ М. и ДРАГОН В., Образование липидных перекисей в тканях облученных и радиозащищенных крыс	2	219
КОТАРИУ ДИТА, Триптический гидролиз водорастворимых белков мозга	2	263
КЫРСТЯНУ МИОАРА, Влияние коацервата сыворотки с гуммиарабиком на активность каталазы печени лошади и каталазы, экстрагированной из пшеницы	1	39
КАТРИНА И., ШЕЛЛ Х. Д., ИОРДАКЕ КОРИНА и НИЦУ КОРНЕЛИЯ, Физиологические и биохимические исследования, связанные с явлением высыхания дуба	1	25
МАКОВСКИЙ ЕУДЖЕН, Некоторые перспективы биохимических исследований в области вегетативной гибридизации растений	2	193
МАКОВСКИЙ ЕУДЖЕН и ИОРДАКЕ КОРИНА, Содержание фосфагена при различных функциональных состояниях мышцы	2	207
МАКОВСКИЙ Е., МИХЭЕСКУ А. и ПОПЕСКУ А. Процесс измерения эндосмоса йода в шейке матки	1	113
МАКОВСКИЙ ЕУДЖЕН, СТЕОПОЕ И. и ЧАУШЕСКУ С. Исследование строения коацерватов цитологическим методом	3	323
МАКОВСКИЙ ЕУДЖЕН, РЭДУЛЕСКУ ТРАЯН и СКОЛЬНИК ЛОРА, Эксосмос неорганического фосфора как показатель состояния мышцы. Предварительное сообщение	4	485
МЕЗИНЧЕСКУ М. Д., ПОПЕСКУ-ШТЕФЭНЕСКУ А., КРИСТЯ Е. и ДИНУ И., Метод исследования случайных изменений потребности в азоте	4	527
МОЦОК ФЛОРИКА и КОНСТАНТИНЕСКУ СМАРАНДА, Способность трансаминирования печени во время неоплазматического процесса	1	91

	№	Стр.
ОЕРИУ С., ГРИГОРЕСКУ Г. и МЭНЕСКУ М., Динамика липидного фосфора в зависимости от возраста животного и влияния некоторых свойственных организму веществ	3	347
ОЕРИУ С., КОСТЕСКУ Г., ТЕОДОРЕСКУ О. и ШОЙМУ И., Исследование активности кокарбоксилазы, трансаминазы и способности трансацетилирования в процессах старения	3	337
ОЕРИУ С., ТИГЕЧИУ-ДУМИТРЕСКУ М., и ЕНАКЕ-ПЕРЕДЕРИ Л., Исследование активности некоторых окислительно-восстановительных энзимов в процессах старения	3	343
ОЕРИУ С., ТЭНАСЕ И. и ДИНУ В., Исследование содержания аминокислот при экспериментальном туберкулезе у морских свинок	3	331
ОНЕШАНУ Д., Фотометрический метод определения 11-α гидроксипрогестерона в подвергнутых брожению средах	3	453
ПЭУНЕСКУ Е., Соотношения между химическим строением, окислительно-восстановительным потенциалом и туберкулостатической активностью некоторых химиотерапевтических веществ (этионамид, ГИК, тиосемикарбазон, аскорбиновая кислота)	4	587
СОРУ ЕУДЖЕНИЯ и ИОНЕСКУ-СТОЯН ФЛОРИКА, Очистка гиалуронатлиазы путем хром атографирования на Deae Sephadex	4	497
ФУРНИКЭ М. и ФУРНИКЭ Г., Биохимические исследования процессов радиозащиты	2	251
ФУРНИКЭ М. и СПИРИДОН М., Скорость окисления с образованием пероксидов гомогенатов тканей при облучений in vitro	3	447
ХАРАЛАМБИЕ Г., Реакция уророзеина при физической нагрузке	1	77
ШЕЛАРИУ К. и МИХЭЕСКУ С., Распределение трансаминов по электрофоретическим фракциям растворимых белков митохондрий мозга и печени крысы	1	97
ШОРМ Ф., Белки, строение и функция их	2	171

ACADÉMIE DE LA RÉPUBLIQUE POPULAIRE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOCHIMIE

ÉTUDES ET RECHERCHES DE BIOCHIMIE

Tome V 1962

INDEX ALPHABÉTIQUE

	N°	Page
ALEXANDRESCU VICTORIA, Localisation de l'activité de l'amylase et de l'invertase dans les fractions protéiques solubles des semences de maïs . .	1	7
ALEXANDRESCU VICTORIA, Localisation de l'activité des l'amylase et de l'invertase sur les fractions protéiques solubles des semences de maïs pendant la germination	3	399
ANIŢIA N., ILIE C., VOICULESCU MARIA, La variation de la nicotine dans les feuilles de tabac, par étages, sous l'influence de l'azote du sol	2	235
ANTOHI S., ANTOHI MARIA, Dispositif pour l'électrophorèse microscopique des particules biologiques en suspension	1	117
ARNET LIA, L'action inhibitrice de l'urée sur la peroxydase des feuilles de maïs et l'effet protecteur des ions de cuivre	1	17
BODEA C., LÁSZLÓ T., Recherches sur les caractères biochimiques spéciaux du maïs. II. Sur le potentiel rédox des graines de maïs	3	351
BODEA C., TĂMAŞ V., Transformation de la zéaxanthine en eschscholtz xanthine et mutato xanthine par l'action du tétraacétate de plomb	3	359
BURUIANĂ L. M., HADARAG EL., Modifications adaptatives de la phosphomonoestérase érythrocytaire au cours de l'évolution phylogénétique . .	3	377
BURUIANĂ L. M., HADARAG EL., PAVLU V., Recherches sur les protéines du plasma séminal	4	507
BURUIANĂ L. M., PAVLU V., Effet des radiations sur les protéines. VI. Influence des rayons γ sur les protéines du cristallin	3	365
BURUIANĂ L. M., PAVLU V., Effet des radiations gamma (^{60}Co) sur la catalase	4	517
BRAD I., LÁSZLÓ IULIA, VALUŢĂ GH., MICLEA CLEMENŢA, Influence que la transplantation de l'embryon d'orge sur l'endosperme de seigle exerce sur quelques processus biochimiques des hybrides en corrélation avec la résistance au gel	4	551
CATRINA I., SCHELL H. D., IORDACHE CORINA, NIŢU CORNELIA, Recherches physiologiques et biochimiques en rapport avec le phénomène de mort du chêne	1	25
CÂRSTEANU MIOARA, L'influence du coacervat sérum-gomme arabique sur l'activité de la catalase hépatique du cheval et sur l'activité de la catalase du blé	1	39

COSTĂCHEL O., FURNICĂ M., DRAGON V., Formation des peroxydes lipidiques dans les tissus des rats irradiés et radioprotégés 2 219
COTARIU DITA, Hydrolyse tryptique des protéines hydrosolubles du cerveau 2 263
DUMITRU I. F., Brain biochemistry. I. Severing of phospholipids of the brain in silicagel column. Determination of recovering speed in phospholipid compounds by means of radioactive isotopes (^{14}C) 3 435
DUMITRU I. F., Biochemistry of brain. II. Studies on the quantity and the rate of recovering the total lipidic fraction of brain. 4 561
DUMITRU I. F., Biochemistry of brain. III. A study on the rate of recovering the total phospholipids and of the main phospholipidic constituents of brain, by means of radioactive carbon, ^{14}C 4 573
ENĂCHESCU GEORGETA, ŞOLDEA I., MARINESCU RODICA, Les modifications biochimiques des bulbes d'oignon pendant l'hiver 1 47
ENĂCHESCU GEORGETA, Aspects du métabolisme de l'acide ascorbique chez les solanacées 2 245
FURNICĂ M., FURNICĂ G., Etude biochimique du processus de radioprotection 2 251
FURNICĂ M., SPIRIDON M., La vitesse de peroxydation des homogénisats de tissus lors de leur irradiation *in vitro* 3 447
GEORGESCU P., CONSTANTINESCU ELENA, Microméthode pour le dosage du cholestérol total, estérifié et libre 4 595
GHEŢIE VICTOR, BUZILĂ LUCIA, Les cryoprotéines végétales. Note préliminaire 1 65
GHEŢIE VICTOR, BUZILĂ LUCIA, Recherches immunochimiques sur la germination de la fève (*Vicia faba*) 4 541
GHEŢIE VICTOR, MOŢET-GRIGORAŞ DAN, L'électrophorèse et l'immunodiffusion des protéines dans le gel d'agarose 3 409
GURBAN C., CRISTEA ELENA, Influence des découplants, des inhibiteurs du transport d'électrons et de la concentration du milieu sur le quotient de la phosphorylation au succinate 3 415
GURBAN C., CRISTEA ELENA, Influence de la durée d'incubation sur la valeur du rapport de phosphorylation au succinate 3 423
HARALAMBIE G., La réaction de l'urorosséine au cours de l'effort physique 1 77
IDU S. M., COCIUMIAN LUCIA, GEORGESCU VL., Rétention du bleu de bromphénol par les fractions protéiques sériques en présence de fixateurs 2 271
KIŢULESCU I., BĂLUŢĂ V., Données biochimiques sur la signification de l'activité des cathepsines des tissus cancéreux et non cancéreux 2 227
MACOVSCHI EUGEN, New aspects of biochemical research in vegetative hybridization 2 193
MACOVSCHI EUGEN, IORDACHE CORINA, Taux du phosphagène aux différents états fonctionnels du muscle 2 207
MACOVSCHI E., MIHĂESCU A., POPESCU A., Procédé pour la mesure de l'endosmose de l'iode dans le col utérin 1 113
MACOVSCHI EUGEN, RĂDULESCU TRAIAN, SCOLNIC LORA, L'exosmose du phosphore inorganique comme test de l'état du muscle (note préliminaire). 4 485
MACOVSCHI E., STEOPOE I., CEAUŞESCU S., Etude de la structure des coacervats par la méthode cytologique. 3 323
MEZINCESCU M. D., POPESCU-ŞTEFĂNESCU A., CRISTEA E., DINU I., Méthode pour l'étude des variations contingentes du besoin en azote . . 4 527
MOŢOC FLORICA, CONSTANTINESCU SMARANDA, La capacité de transamination du foie au cours du processus néoplasique 1 91
OERIU S., COSTESCU G., TEODORESCU O., ŞOIMU I., Activité de la co-carboxylase et de la transaminase et capacité de transacétylation dans les processus de vieillissement 3 337
OERIU S., GRIGORESCU G., MĂNESCU M., Dynamique du phosphore lipidique en fonction de l'âge de l'animal et sous l'action de certaines substances propres à l'organisme 3 347
OERIU S., TĂNASE I., DINU V., Etude de l'aminoacidémie dans la tuberculose expérimentale du cobaye 3 331

OERIU S., TIGHECIU-DUMITRESCU M., ENACHE-PEREDERI L., Activité de certaines enzymes d'oxydo-réduction dans les processus de vieillissement 3 343
ONEŞANU D., Une méthode photométrique pour le dosage de la 11 α-hydroxy-progestérone des milieux fermentés 3 453
PĂUNESCU EUG., Corrélations entre la structure chimique, le potentiel oxydo-réducteur et l'activité tuberculostatique de quelques substances chimiothérapeutiques (éthionamide, hydrazide I. N., thiosemicarbazone, acide ascorbique) 4 587
SORU EUGENIA, IONESCU-STOIAN FLORICA, Purification de l'hyaluronate-lyase par chromatographie sur DEAE-Sephadex 4 497
ŞELARIU C., MIHĂESCU S., La répartition des transaminases suivant les fractions électrophorétiques des protéines solubles contenues par les mitochondries du cerveau et du foie de rat 1 97
ŠORM F., Les protéines, structure et fonction 2 171
VASILESCU I., BOLTAŞU G., Production biosynthétique de la riboflavine . 3 383
ZAHARIA ODETTE, L'oxydation de certains acides aminés en présence du système polyphénoloxydasique des plantes 1 103

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI R.P.R.

ILIE VASILESCU, **Enzimele**, 429 p., 22, 80 lei.

T. NĂŞCUŢIU, **Cromatografia pe hîrtie a substanţelor anorganice**, 220 p. + 3 pl., 13,90 lei.

J. REICHEL, **Tehnologia coloranţilor antrachinonici**, 440 p. + 3 pl., 21,50 lei.

Pentru a vă asigura o colecție completă și primirea la timp a revistei, reînnoiți abonamentul dv. pentru anul 1963.
ABONAMENTELE SE FAC LA OFICIILE POȘTALE, AGENȚIILE POȘTALE, FACTORII POȘTALI ȘI DIFUZORII VOLUNTARI DIN ÎNTREPRINDERI ȘI INSTITUȚII

Din

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

au apărut:

Anul I, 1958, 4 n-re (a 5 lei);
Anul II, 1959, 4 n-re (a 5 lei);
Anul III, 1960, 4 n-re (a 5 lei);
Anul IV, 1961, 4 n-re (a 5 lei);
Anul V, 1962, 3 n-re (a 5 lei).

Numerele curente se găsesc de vînzare la

LIBRĂRIA ACADEMIEI R.P.R.

Bucureşti, Calea Victoriei nr. 27, sau la orice librărie ştiinţifică din ţară

Se pot comanda şi prin poştă la Secţia „Cartea prin poştă" de pe lîngă Librăria Academiei R.P.R., sau la librăria

„CARTEA PRIN POŞTĂ"

Bucureşti, str. Biserica Enei nr. 16, raionul 30 Decembrie

Abonamentele se fac la oficiile poştale, prin factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Pentru străinătate, cererile de numere izolate sau de abonamente se fac prin Întreprinderea de stat pentru comerţul exterior „Cartimex", str. Aristide Briand nr. 14, sau căsuţa poştală 134—135, Bucureşti.

I. P. 2, c. 4328

Lei 7.—